Aus der Abteilung Neonatologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Mentzel
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Die isolierte Rattenlunge als Modell zur Erprobung künstlicher Surfactantsubstitute

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
CHRISTOPH SCHÖLL
aus Stuttgart

1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536518_0008

Aus der Abteilung Neonatologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Mentzel
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Die isolierte Rattenlunge als Modell zur Erprobung künstlicher Surfactantsubstitute

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
CHRISTOPH SCHÖLL
aus Stuttgart

1984

Dekan: Professor Dr. D. Plester
1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Obladen
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. K. Decker

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

GLIEDERUNG

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
	Pathogenese und klinische Bedeutung des Atemnotsyndroms	
	Substitutionsversuche an frühgeborenen Tieren	
	Substitutionsversuche an Neugeborenen	
	Das Modell der isolierten Tierlunge	
2.	FRAGESTELLUNG	4
	Ist die isolierte, gespülte Rattenlunge ein geeignetes Modell um Effekte der Surfactantsubstitution quantitativ zu erfassen?	
3.	METHODIK	5
3.1.	Material	5
3.2.	Versuchsaufbau	6
3.2.1.	Inkubator	6
3.2.2.	Spritzenantrieb	6
3.2.3.	Druckaufzeichnung	7
3.2.4.	Steuerungs- und Verstärkungsteil	7
3.2.5.	Beatmungsgerät	1o
3.2.6.	X-Y-Schreiber	1o
3.3.	Eichung der Meßapparatur	11
3.4.	Präparation der Lunge	12
3.5.	Aufzeichnung eines Druck-Volumen Diagramms	12
3.6.	Aufzeichnung der Time-Base Versuche	13
3.7.	Spülung der Lungen	13
3.8.	Surfactantsubstitution	13
3.8.1.	Berechnung der Lungenoberfläche	13
3.8.2.	Berechnung der notwendigen Surfactantmenge	14
3.8.3.	Herstellung der Surfactantsubstitute	14
3.8.4.	Prüfung auf der Wilhelmywaage	15
3.8.5.	Weiterbehandlung der substituierten Lunge	15

Seite

3.9. Auswertung der Druck-Volumen Diagramme 15

3.1o. Zusätzliche Methoden 15

3.1o.1. Lipidextraktion und zweidimensionale Dünnschichtchromatographie 16

3.1o.2. Phosphorbestimmung 16

3.11. Histologische Untersuchungen 16

3.12. Elektronenmikroskopische Untersuchungen 16

3.13. Statistische Methoden 17

4. VERSUCHE MIT ISOLIERTEN KANINCHENLUNGEN 17

5. ERGEBNISSE 18

5.1. Versuche mit isolierten Rattenlungen 18

5.2. Spülung des kleinen Kreislaufes 19

5.3. Spülmethodik 24

5.3.1. Vergleich der verbleibenden Spülflüssigkeit 24

5.3.2. Durch Spülung entfernte Phosphormenge 24

5.3.3. Unterschiede in den Druck-Volumen Diagrammen 24

5.3.4. Einfluß der Menge der Spülflüssigkeit 26

5.3.5. Histologische Untersuchungen 26

5.3.6. Untersuchung der Spülflüssigkeit 29

5.4. Substitution der gespülten Lunge 31

5.5. Prüfung der Substitute auf der Wilhelmy-waage 36

5.6. Dünnschichtchromatographie und Phosphor-bestimmung 38

5.7. Elektronenmikroskopisches Erscheinungs-bild des natürlichen Surfactant 39

5.8. Time-Base Versuche 41

6. METHODENDISKUSSION

6.1. Vergleich des eigenen Versuchsaufbaus mit anderen Verfahren 42

Seite

6.1.1. Methode nach RÜFER 42
6.1.2. Methode nach FRAZER 42
6.1.3. Methode nach GRIBETZ 43

6.2. Aufzeichnung von Druck-Volumen Diagrammen 44
6.2.1. Literaturüberblick 44
6.2.2. Präparation der isolierten Lunge 45
6.2.3. Vorbehandeln der isolierten Lunge 46
6.2.4. Aufzeichnung des Druck-Volumen Diagramms 47
6.2.5. Auswertung des Druck-Volumen Diagramms 49

6.3. Entfernung des vorhandenen Surfactant 51

6.4. Surfactantsubstitution 52
6.4.1. Herstellung des natürlichen Surfactant 52
6.4.2. Instillation und Menge des Substitutes 52

6.5. Beatmung 53

7. ERGEBNISDISKUSSION 58

7.1. Spülung des kleinen Kreislaufes 58

7.2. Spülung der Lungen 58

7.3. Substitution der gespülten Lunge 59
7.3.1. Substitution mit natürlichem Surfactant 59
7.3.2. Substitution mit künstlichem Surfactant 6o

7.4. Untersuchungen auf der Wilhelmywaage 6o

8. ZUSAMMENFASSUNG 61

9. LITERATURVERZEICHNIS 63

1. EINLEITUNG

Nachdem PATTLE (7o) und CLEMENTS (9) bewiesen hatten, daß Säugetierlungen oberflächenaktive Substanzen enthalten, erkannten AVERY (3) und GLUCK (35), daß ein relativer Mangel dieser "Surfactant" genannten Substanzen der wesentliche pathogenetische Faktor für das Atemnotsyndrom des Neugeborenen ist. Die aufgrund der epidemiologischen Bedeutung des Atemnotsyndroms in der Neugeborenenphase (15, 23, 42) einsetzende intensive Forschung ergab bald die ersten Versuche, Surfactant zu substituieren. Der Grundgedanke dabei ist, das Stadium ungenügender Synthese oder gestörter Ausschüttung aus den Typ II Zellen zu überspringen und den Surfactant direkt in die Lunge zu applizieren.

Grundsätzlich muß man dabei zwei Forschungsrichtungen unterscheiden: Auf der einen Seite wird ein aus Lungenlavagen gewonnener, sogenannter natürlicher Surfactant verwendet, auf der anderen Seite ein synthetisches Surfactantsubstitut. Seit der weitgehenden Aufklärung der chemischen Surfactantzusammensetzung (41) bestehen diese Substitute meist aus zwei Phospholipiden, wobei zweifach gesättigtes Phosphatidylcholin (DPPC) immer die Hauptkomponente stellt, zu der meist Phosphatidylglycerol (PG) als Minorkomponente hinzugefügt wird, besonders seit das Fehlen von PG als charakteristisch für das Atemnotsyndrom erkannt wurde (7, 12).
Wie aus Tab. 1 hervorgeht, haben bereits eine ganze Reihe von Autoren an Tieren erfolgreich Surfactantsubstitutionen durchgeführt, wobei alle bis auf MORLEY (63) natürlichen Surfactant verwendeten. Als Modell dienten frühgeborene Tiere, die zu einem Zeitpunkt geboren wurden, an dem der Reifungszustand der Lungen dem eines Frühgeborenen mit Atemnotsyndrom entsprach.
Tab. 2 zeigt, daß in der Vergangenheit auch schon einige Behandlungsversuche am menschlichen Frühgeborenen durchgeführt wurden, die jedoch außer bei MORLEY (64) keine Erhöhung der Überlebensrate, sondern höchstens eine kurzfristige Verbesserung klinischer

Tab. 1: Literaturübersicht über bisherige erfolgreiche Surfactantsubstitutionen bei frühgeborenen Tieren

Autor	Lit.	frühgeborenes Tier	Substitut	Bewertungskriterien
ENHÖRNING 1972	16	Kaninchen	Lungenlavage konzentriert	Druck-Volumen Diagramm, Lungenbelüftung
ROBERTSON 1974	72	Kaninchen	Lungenlavage konzentriert	Überlebenszeit, Lungenbelüftung
ENHÖRNING 1978	18	Rhesusaffen	Lungenlavage konzentriert	Druck-Volumen Diagramm, Lungenbelüftung
ADAMS 1978	2	Lämmer	Lungenlavage konzentriert u. gereinigt	Überlebenszeit, Blutgase, Lungenbelüftung
FUIJWARA 1979	3o	Kaninchen	Lungenlavage konzentriert,mit DPPC/PG angereichert	Epithelläsion
IKEGAMI 198o	45	Lämmer	Lungenlavage konzentriert u. gereinigt	Blutgase, Druck-Volumen Diagramm
MORLEY 198o	63	Kaninchen	DPPC/PG 7:3 trocken	Druck-Volumen Diagramm Epithelläsion
JOBE 1981	5o	Lämmer	Lungenlavage konzentriert u. gereinigt	Blutgase, Compliance
LACHMANN 1981	59	Kaninchen	Lungenlavage konzentriert	Beatmungsparameter, Lungenbelüftung, Epithelläsion

Tab. 2: Literaturübersicht über Surfactantsubstitutionsversuche am menschlichen Frühgeborenen ($AaDO_2$ = Alveolär arterielle Sauerstoffdruckdifferenz)

Autor	Lit.	Substitut	Applikationsart	Ergebnis
ROBILLARD 1964	74	DPPC	Ultraschallnebel	kurzfristige Besserung klinischer Parameter
CHU 1967	8	DPPC	Ultraschallnebel	kurzfristige Besserung klinischer Parameter
IVEY 1977	49	DPPC/DPPG	Ultraschallnebel	kurzfristige Erniedrigung der $AaDO_2$
FUIJWARA 198o	32	Rinderlavage konzentriert mit DPPC u. PG angereichert	1o ml tracheal instilliert, Alter 12 h	Erniedrigung der $AaDO_2$ und des Atmungsdrucks
MORLEY 1981	64	DPPC/PG 7:3 trocken	25 ml tracheal verstäubt bei Geburt	Erniedrigung des Beatmungsdrucks, Verbesserung der Überlebensrate und klinischer Parameter

Parameter ergaben.
Da gegen den Proteinanteil des natürlichen Surfactant immunologische Bedenken bestehen (67, 73), andererseits aber die künstlichen Substitute noch keine vergleichbaren Ergebnisse liefern (43, 44, 63, 67), ist es notwendig, zu ihrer Verbesserung weitere Studien durchzuführen. Dabei bietet sich als einfaches Modell zur Erprobung die isolierte Tierlunge an, bei der ein Teil der oberflächenaktiven Substanzen durch wiederholte Lungenlavagen entfernt wird. Die so behandelten Lungen zeigen einen höheren Öffnungsdruck, eine geringere Stabilität in der Deflationsphase und eine verminderte dynamische Compliance (29, 43, 58, 75), ähnlich den Veränderungen beim Atemnotsyndrom des Frühgeborenen. In seinen wegweisenden Versuchen zeigte RÜFER (75) als erster, daß sich die Druck-Volumen-Charakteristik von isolierten gespülten Rattenlungen durch Spülung mit natürlichem Surfactant ("Befilmung") wiederherstellen läßt.
In weiteren Versuchen (76) konnte er außerdem nachweisen, daß sich die Druck-Volumen Relation der Lungen von am Atemnotsyndrom verstorbenen Kindern ebenfalls durch "Befilmung" entscheidend verbessern läßt. Leider wurden diese Versuche über lange Zeit nicht weiterverfolgt. Erst IKEGAMI (43) erzielte eine weitgehende Normalisierung der Lungenstabilität durch Instillation von natürlichem Surfactant.

2. FRAGESTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob die isolierte Rattenlunge ein geeignetes Modell darstellt um Effekte der Surfactantsubstitution quantitativ zu erfassen.

Trotz der erfolgreichen Versuche an frühgeborenen Tieren soll das einfachere Modell der isolierten Tierlunge erarbeitet werden, um ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit dem schnell und unkompliziert einige der Wirkungen künstlicher Surfactantsubstitute überprüft werden können. Es ist als Bindeglied zwischen den Untersuchungen auf der Wilhelmywaage und den sehr viel komplizierteren Versuchen mit frühgeborenen Tieren gedacht.
Die Brauchbarkeit des Modells wurde an folgenden Kriterien überprüft:

- einfache Durchführbarkeit der Versuche, damit in späteren Meßreihen eine große Anzahl von künstlichen Surfactantsubstituten geprüft werden kann.
- die oberflächenaktive Substanz muß durch Spülung entfernt werden können, ohne daß die Struktur der Lunge zerstört wird.
- es müssen sich meß- und reproduzierbare Unterschiede im Druck-Volumen Diagramm der ungespülten zur alveolär gespülten Lunge ebenso ergeben wie zwischen alveolär gespülter und substituierter Lunge.
- unterschiedliche Oberflächenaktivität von Surfactantsubstituten, die sich auf der Wilhelmywaage zeigt, muß auch bei dem Modell deutlich werden.
- Veränderungen der Lungenstabilität, bedingt durch den Versuchsaufbau und die lange Versuchsdauer müssen abgrenzbar sein von Veränderungen der Lungenstabilität, die durch Spülung oder Substitution von Surfactant entstehen.

3. METHODIK

3.1. Material

DPPC: DL-α-Dipalmitoylphosphatidylcholin, Grad I kristallin, synthetisch, Reinheit 99%

PG: L-α-Phosphatidyl-DL-Glycerol, Ammoniumsalz Grad I, aus Eigelblecithin, Reinheit 98%

beide von SIGMA (München)

Methanol, Chloroform, analytischer Reinheitsgrad von MERCK (Darmstadt)

sterile o,9% Natriumchloridlösung und sterile Ringerlösung von FRESENIUS (Bad Homburg)

Nembutal (Phenobarbital Natrium) 6o mg/ml von CEVA GmbH (Bad Segeberg)

Äther zur Narkose von HOECHST (Frankfurt)

3.2. Versuchsaufbau

3.2.1. Inkubator

Um bei Körpertemperatur arbeiten zu können und um ein Austrocknen der isolierten Lunge während des Versuches zu verhindern, wurden nach einigen Vorversuchen alle Versuche in einem Inkubator (Typ II-M13oo, Firma Dräger Lübeck) durchgeführt. Dadurch war die Temperatur stufenlos von Zimmertemperatur bis 37°C regelbar. Die Luftfeuchtigkeit konnte zwischen 2o% und 8o% eingestellt werden. Die Versuche wurden alle bei 37°C und 8o% Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Anfängliche Temperatur- und Feuchtigkeitsschwankungen wurden durch sorgfältiges Abdichten des Inkubators behoben.

3.2.2. Spritzenantrieb

Bei dem Spritzenantrieb handelte es sich um eine Eigenkonstruktion. Ein Gleichstrommotor trieb über ein Riemengetriebe mit unterschiedlichen Übersetzungsmöglichkeiten eine Gewindestange an, auf der die Halterung für den Spritzenstempel angebracht war. Durch ein über einen Spanndraht mitlaufendes Wendelpotentiometer wurde der Weg und damit proportional das Volumen kontinuierlich erfaßt.
Die Geschwindigkeit wurde durch die Wahl der Übersetzung des Riemengetriebes bestimmt und konnte dann durch die unterschiedliche Einstellung der Speisespannung fein einreguliert werden.

Technische Daten des Motors:

Gleichstrommotor ITT Dunkermotoren
Typ: GR 32.o
Spannungsbereich: 15 - 42 V
Maximalstrom: o,69 A
Drehzahl: 15oo - 645o U/min.

Als Spritze wurde eine Glasrekordspritze mit einem Volumen von 5o ml verwendet. In Vorversuchen hatte sie sich im Vergleich zu einer Kunststoffspritze als günstiger erwiesen. Das Schlauchsystem bestand aus Polyäthylenschläuchen mit einem Durchmesser von 2,5 mm

und einer Gesamtlänge von 1,5 m. Die Drei-Wege-Hähne waren aus Metall mit Luer-Lock Ansätzen. Sämtliche Ansatzstellen wurden verklebt und während der Versuche laufend auf ihre Dichtigkeit überprüft.

3.2.3. Druckaufzeichnung

Die Druckaufnahme erfolgte mit einem Druckwandler (Hewlett Packard), der sich immer auf Höhe der isolierten Lunge befand. Es erwies sich als günstig, den Meßkopf mit destilliertem Wasser zu füllen, da dadurch einerseits eine bessere Abdichtung des Systems und andererseits eine höhere Meßgenauigkeit erreicht wurde.

Technische Daten des Druckwandlers:

Physiological Pressure Transducer

Hewlett Packard, Serie 128o

Meßbereich:	linear von -1oo mm Hg - +4oo mm Hg
nichtlineare Abweichung:	o,1%
Hysterese:	o,1%
Empfindlichkeit:	4o µV/V/mm Hg

3.2.4. Steuerungs- und Verstärkungsteil

Das Steuerungs- und Verstärkungsteil bestand aus vier Geräten, dem Transformator, dem Motor-Controller, der Motor Drive Logik und dem Transducer Amplifier (es wurde in den Wissenschaftlichen Werkstätten der Universität Heidelberg entwickelt).

Der Transformator (1) lieferte die Gleichspannungen von 42 V für den Elektromotor des Spritzenantriebs, sowie von 15 V für die Verstärkereinheiten von Weg- und Druckaufnehmer.

Der Motor-Controller (2) diente zum Ansteuern von Gleichstrommotoren kleiner Leistung. Einstellbar waren die Motordrehzahl, der maximale Motorstrom, sowie die Drehrichtung. Der Motor wurde beim Abschalten über Stopimpulse elektrisch abgebremst. Mit dem Drehpotentiometer "Motor Voltage" ließ sich die Motorspannung und

somit die Drehzahl einstellen. Der Einstellbereich lag zwischen 0 V und 42 V. Da keine Rückführung vom Motor vorgesehen war, konnten Gleichlaufschwankungen von dieser Steuerungseinheit nicht automatisch ausgeglichen werden. Mit dem Schalter Front/Stop/Back konnte die Drehrichtung des Motors geändert oder der Motor gestoppt werden. Dieselbe Möglichkeit bestand über eine Fernsteuerleitung am Spritzenantrieb, wenn der Schalter des Motor-Controller auf Stop stand.

Mit der Motor Drive Logik (3) konnte ebenfalls der Gleichstrommotor des Spritzenantriebs gesteuert sowie über einen externen Wegaufnehmer der zurückgelegte Weg erfaßt werden. Mit Hilfe eines Umschalters wurde zwischen manuellem und automatischem Betrieb gewählt.
Beim manuellen Betrieb konnte über die Schalter am Motor-Controller und Spritzenantrieb ein Start des Elektromotors in beiden Richtungen sowie ein Stop bewirkt werden. Beide Richtungen und das Stoppen wurde über Leuchtdioden angezeigt. Der automatische Betrieb unterschied sich dadurch, daß bei Anwendung der externen Endschalter am Spritzenantrieb nicht gestoppt, sondern die Drehrichtung geändert wurde. Diese Betriebsart war bei den durchgeführten Versuchen nicht möglich, da die Lungenvolumina bei 25 cm H_2O unterschiedlich waren.
Die Spannung des externen Wegaufnehmers wurde in einem DC-Verstärker verstärkt und über zwei Telefonbuchsen zugänglich gemacht,um direkt einen X-Y-Schreiber ansteuern zu können. Über ein Drehpotentiometer (Gain) ließ sich die Verstärkung einstellen. Über ein zweites Drehpotentiometer (Zero) war eine Verschiebung des Nullpunktes am Schreiber möglich. Eine Leuchtdiode zeigte das Erreichen des Nullpunktes an.

Der Transducer Amplifier (4) verstärkte die Spannung des externen Druckwandlers. Ebenso wie bei der Motor Drive Logik konnte über zwei Drehpotentiometer die Verstärkung (Gain) und der Nullpunkt (Zero) am X-Y-Schreiber eingestellt werden. Auch hier wurde das Erreichen des Nullpunktes durch eine Leuchtdiode angezeigt.

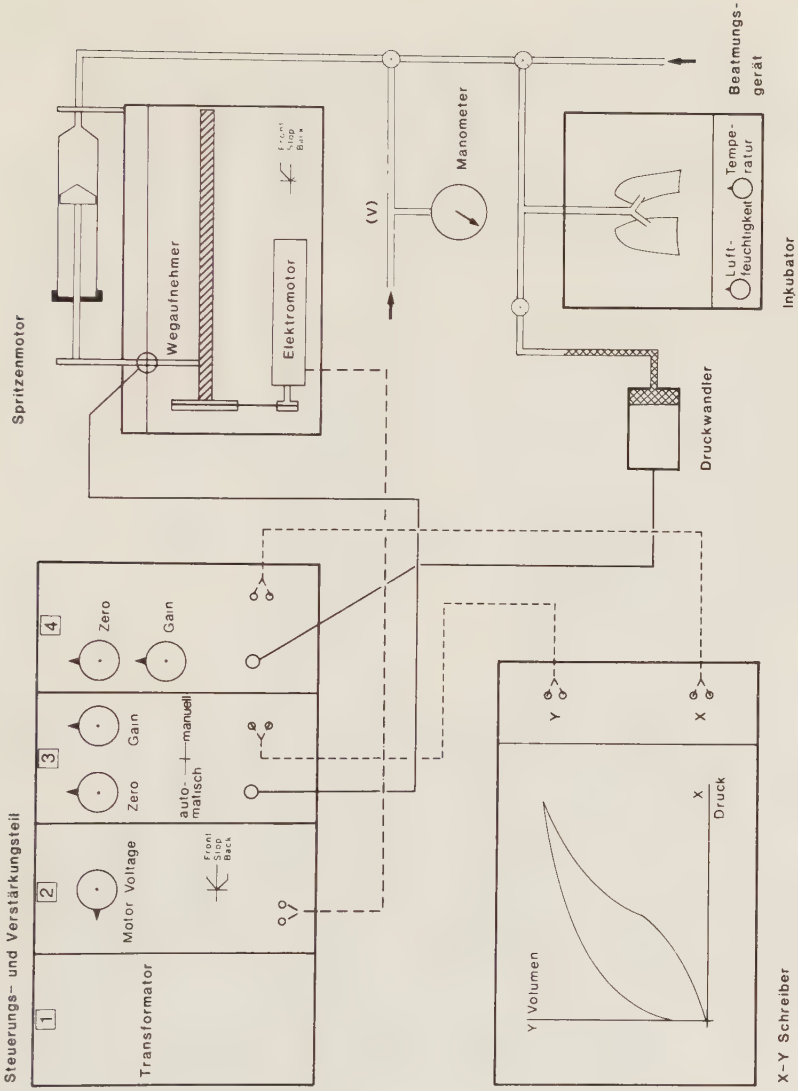


Abb. 1: Versuchsaufbau; (V) = Schlauch zur kurzfristigen Druckerhöhung im System. Weitere Beschreibung im Text.

3.2.5. Beatmungsgerät

Ein zeitgesteuerter, flowkonstanter Respirator wurde für die Beatmung der isolierten Lunge konstruiert. Luftstrom, Beatmungsdruck, endexspiratorischer Druck, Frequenz, sowie das Verhältnis von Inspirations- zu Exspirationszeit waren unabhängig regelbar. Folgende Einstellungen wurden zur Beatmung der isolierten Lungen verwandt: Frequenz 14/min, Inspirationsdruck 25 cm H_2O, Flow 1 l/min, positiv-endexspiratorischer Druck 6 cm H_2O.
Der konstante Luftstrom wurde über ein Reduzierventil gesteuert, dem ein Druckminderer direkt an der Pressluftflasche vorgeschaltet war. Durch Heben bzw. Senken eines Glasrohres in einem mit Wasser gefüllten Standzylinder wurden sowohl der Beatmungsdruck als auch der endexspiratorische Druck eingestellt. Ein Manometer diente der zusätzlichen Druckkontrolle.
Die Steuerung des Elektromagnetventils (Martonair) erfolgte durch zwei Drehpotentiometer, mit denen die Frequenz und das Verhältnis von Inspirations- zu Exspirationszeit stufenlos regelbar waren.

3.2.6. X-Y-Schreiber

Mit dem X-Y-Schreiber (Hewlett Packard 7o15B) wurde aus den übermittelten Meßwerten das Druck-Volumen Diagramm kontinuierlich aufgezeichnet. Zu Beginn der Versuche wurde die Verstärkung und die Nullpunkte am Schreiber grob eingestellt. Die Feinregulierung erfolgte während der gesamten Versuchsdauer am Steuerungs- und Verstärkungsteil.
Für die Time-Base-Versuche konnte der X-Y-Schreiber umgeschaltet werden.

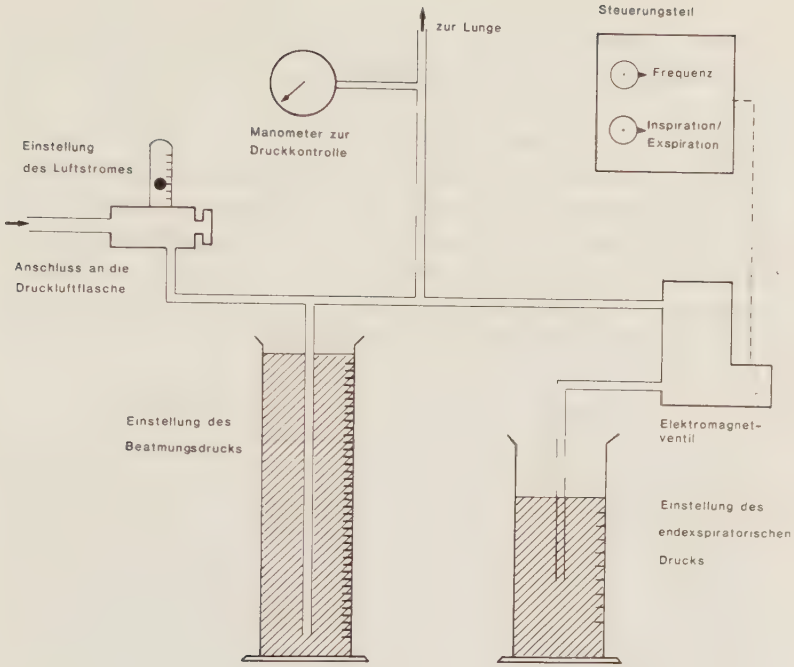


Abb. 2: Schematischer Aufbau des Beatmungsgerätes

3.3. Eichung der Meßapparatur

Vor der Eichung mussten sowohl der Druckwandler als auch das Steuerungsteil mindestens 6o min in Betrieb sein, damit sie ihr elektrothermisches Gleichgewicht erreichen konnten und es während der Versuche nicht zu Nullpunktverschiebungen kam.

Die Volumeneichung erfolgte über die Skala der Rekordspritze. Vor jedem Versuch wurde eine Eichung durchgeführt. Während der Versuche wurden Störfaktoren wie Veränderungen derRaumtemperatur und Zugluft ausgeschaltet.
In Bezug auf die Dichtigkeit des Gesamtsystems wurden folgende Anforderungen gestellt: Bei einem Druck von 15 cm H_2O musste der Druckabfall nach 5 Minuten kleiner als 1 cm H_2O sein.

3.4. Präparation der Lunge

Es wurden 7o männliche Sprague-Dawley-Ratten (Tierzuchtanstalt Dr. Ivanowas, Kißlegg) mit einem Gewicht von 45o - 52o g verwendet.
Während einer kurzen Äther-Inhalationsnarkose wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion von 12o mg Pentobarbital getötet. Nach Sistieren der Atmung wurde 1 cm unterhalb des Kehlkopfes eine Tracheotomie durchgeführt und ein Tubus (Durchmesser 2,5 mm) eingebunden. Um eine gleichmäßige Belüftung beider Lungen zu gewährleisten, wurde darauf geachtet, daß die Tubusspitze oberhalb der Bifurkatio tracheae lag. Nach Eröffnen des Abdomens erfolgte eine Stichinzision des Zwerchfells im Bereich der Herzbasis, um die Lungen zum Kollabieren zu bringen. Der Thorax wurde durch einen links parasternalen Schnitt eröffnet. Nach Freipräparation des Herzens und einer Stichinzision des rechten Ventrikels erfolgte bei 34 Ratten die Katheterisierung der Pulmonalarterie. Die Pulmonalgefäße wurden mit 3 x 1o ml, 37°C warmer Ringerlösung gespült, wobei die Spülflüssigkeit über einen Schnitt im linken Vorhof austreten konnte. Bei 11 Tieren wurde zur Kontrolle der kleine Kreislauf nicht gespült. Abschließend wurde nach Durchtrennung der großen Gefäße Herz und beide Lungen entfernt.

3.5. Aufzeichnung eines Druck-Volumen Diagramms

Über den Tubus wurde die isolierte Lunge an das Meßsystem angeschlossen. Die Unversehrtheit der Lunge wurde durch die kurzfristige (maximal 5 sec) Druckerhöhung im System auf einen Wert von 3o cm H_2O überprüft (75,79). Ein Defekt zeigte sich durch einen raschen Druckabfall auf Werte um 1o cm H_2O. Anschließend begann sofort die Aufzeichnung des Druck-Volumen Diagramms. Die Geschwindigkeit des Spritzenantriebs betrug in allen Versuchen 2 ml/min und wurde zu Beginn jedes Druck-Volumen Diagramms neu eingestellt und während der Aufzeichnung mindestens einmal überprüft. Bei Erreichen des Maximaldruckes von 25 cm H_2O erfolgte die Umschaltung des Spritzenantriebs auf Rücklauf. Sobald der Druck

im System auf 0 cm H_2O abgefallen war, wurde durch Öffnen eines Drei-Wege-Hahnes das Auftreten negativer Drucke verhindert.

3.6. Aufzeichnung der Time-Base-Versuche

Der X-Y-Schreiber wurde umgeeicht, auf der Y-Achse wurde jetzt der Druck aufgezeichnet, während der Schreiber sich mit einer Geschwindigkeit von o,o2 cm/sec entlang der X-Achse bewegte. Sobald der Maximaldruck von 25 cm H_2O erreicht war, wurde der Spritzenantrieb gestoppt und der Schreiber auf eine Geschwindigkeit von 2 cm/sec umgeschaltet. Nach einer Sekunde wurde durch Öffnen eines Drei-Wege-Hahnes das gesamte System druckentlastet.

3.7. Spülung der Lungen

Als Spülflüssigkeit diente 37°C warme Ringerlösung. 1o ml wurden langsam in die Lunge instilliert, zweimal hin und her gespült und vorsichtig wieder abgezogen. Mit jeweils neuer Spülflüssigkeit wurde dieser Vorgang insgesamt zwanzigmal wiederholt. Um eine gleichmäßige Auswaschung des Surfactant zu erzielen wurde die Lunge mehrmals gewendet. Dreimaliges kurzfristiges Blähen bis zu einem Druck von 3o cm H_2O zwischen jedem Spülvorgang sollte eine Eröffnung der Alveolen und damit eine bessere Ausbeute an oberflächenaktiver Substanz gewährleisten (56). Die Spülflüssigkeit wurde bis zur weiteren Aufarbeitung gesammelt und bei -2o°C eingefroren. Das Betropfen der Lungenoberflächen mit Ringerlösung während der 3o - 4o Minuten dauernden Spülung verhinderte ein Austrocknen der Lunge. Zu Beginn und am Ende der Spülung wurde das Präparat gewogen, um einen Überblick über die in der Lunge verbleibende Spülmenge zu erhalten. Sofort anschließend erfolgte die Aufzeichnung eines weiteren Druck-Volumen Diagramms nach der in 3.5. beschriebenen Methode.

3.8. Surfactantsubstitution

3.8.1. Berechnung der Lungenoberfläche

Die Berechnung der Atmungsoberfläche erfolgte nach der Formel von WEIBEL (92):

$$\text{Atmungsoberfläche} = 1o \frac{cm^2}{g} \times \text{Körpergewicht (g)}$$

Damit ergibt sich bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 5oo g eine Atmungsoberfläche der Rattenlungen von o,5 m^2. Dieser Wert stimmt mit anderen Angaben in der Literatur überein (33, 54).

3.8.2. Berechnung der notwendigen Surfactantmenge

Um ein Monolayer einer oberflächenaktiven Substanz zu ermöglichen, errechnenten KING und CLEMENTS (54) einen theoretischen Wert von 1 µg/cm^2 Lungenoberfläche, das ergäbe einen theoretischen Mindestbedarf bei einer 5oo g schweren Ratte von 5 mg Surfactant. IKEGAMI u. Mitarb. (45) fanden bei ihrer Untersuchung an frühgeborenen Lämmern, daß bei Instillation von 19 mg/kg KG Gesamtphospholipide sich eine deutliche Besserung klinischer Parameter (pH, Blutgase) ergab. Bei Mengen über 53 mg/kg Körpergewicht zeigte sich keine weitere Verbesserung im Exspirationsschenkel des Druck-Volumen Diagramms. Von diesen Untersuchungen ausgehend wurden 4o mg/kg Körpergewicht Gesamtphospholipide substituiert. Die Substitutionsmenge des künstlichen Surfactant betrug sowohl 2o mg/kg Körpergewicht, als auch 58 mg/kg Körpergewicht.

3.8.3. Herstellung der Surfactantsubstitute

Es wurden große, unilamelläre Liposomen, bestehend aus DPPC und PG, im Verhältnis 9:1, nach der früher beschriebenen Methodik (68) hergestellt. Es kamen sowohl bei 4°C gelagerte als auch frisch hergestellte Präparationen zur Anwendung. Vor der Instillation wurden alle Substitute auf 37°C erwärmt.
Der sogenannte natürliche Surfactant wurde modifiziert nach dem von ENHÖRNING (16) beschriebenen Verfahren hergestellt. Die Lavagen von mehreren Rattenlungen wurden zusammengefaßt und 3o Minuten bei 4°C mit 3ooo x g zentrifugiert. Aus 2o µl Pellet und 1 ml Überstand wurde jeweils eine Phosphorbestimmung durchgeführt,um die zu substituierende Phospholipidmenge festlegen zu können. Die Konzentration des natürlichen Surfactant wurde auf 1o mg Phospholipid/ml eingestellt.

3.8.4. Prüfung auf der Wilhelmywaage

Vor der Substitution wurden alle Präparationen auf einer modifizierten Wilhelmywaage (36) getestet. Nach Injektion der Probe (2,55 µg/cm²) in die Subphase wurde 5 Minuten gewartet,um die Adsorption und Spreitung zu ermöglichen bevor die Kompression begann. Die komprimierbare Oberfläche des Langmuir-Trogs betrug 392 cm². Der Film wurde auf 2o% seiner Ausgangsfläche komprimiert und anschließend wieder auf 1oo% gedehnt. Die Zykluszeit betrug 4 Minuten. Alle Messungen wurden bei 37°C und einer Luftfeuchtigkeit von 1oo% durchgeführt. Die Subphase bestand aus 2oo ml physiologischer Kochsalzlösung. Als Auswertungsparameter diente γ_{min} (= minimale Oberflächenspannung nach Kompression auf 2o% der Fläche) und γ_{max} (= maximale Oberflächenspannung vor Kompression).

3.8.5. Weiterbehandlung der substituierten Lunge

Nach der Substitution erfolgte eine Einteilung der Lungen in drei Gruppen. Drei Lungen wurden mit einem konstanten Druck von 2o cm H_2O 6o Minuten lang gebläht bevor das abschließende Druck-Volumen Diagramm aufgezeichnet wurde. Zehn Lungen wurden 5 Minuten und vier Lungen 6o Minuten beatmet. Auch hier erfolgte abschließend das dritte Druck-Volumen Diagramm. Die Gesamtversuchsdauer betrug, abhängig von der Beatmungszeit, 9o - 16o min.

3.9. Auswertung der Druck-Volumen Diagramme

Aufgrund der vergleichbaren Versuchsanordnungen erfolgte die Auswertung der Druck-Volumen Diagramme nach der Berechnung von RÖFER (75), zurückgehend auf die Arbeiten von CLEMENTS (1o) und GRUENWALD (4o), sowie nach den Berechnungen von IKEGAMI (41). Andere in der Literatur beschriebene Auswertungsverfahren (34, 65, 69) wurden nicht angewandt. Lungen, deren Volumen bei 5 cm H_2O über 3o% der Lungentotalkapazität bei 25 cm H_2O lag, wurden als nicht hinreichend gespült betrachtet und ausgeschieden.

3.1o. Zusätzliche Methoden

3.1o.1. Lipidextraktion und zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

Die Lipide wurden nach der modifizierten Methode von FOLCH (24) extrahiert. Mittels der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie (37) konnten die einzelnen Phospholipide identifiziert werden. Von den Chromatogrammen wurde sowohl eine Blaupause als auch eine Photographie angefertigt.

3.1o.2. Phosphorbestimmung

Phosphorbestimmungen wurden aus den Lipidextrakten und von Dünnschichtchromatographieplatten durchgeführt, dabei kam die von KANKARE (52) modifizierte Technik nach BARTLETT (5) zur Anwendung. Zu jeder Maßreihe wurde eine Eichkurve mit einer Verdünnungskurve von 2o - 2oo µmol Phosphat angelegt. Der Wert von 1oo µmol Phosphat wurde als Standard verwendet. Alle Proben wurden in einen Photometer (HITACHI-Industries) bei einer Wellenlänge von 82o nm gemessen. Die Extinktion wurde nach der Formel

$$\frac{\text{(Standard) x Extinktion der Probe}}{\text{Extinktion des Standards}}$$

in µmol Phosphor umgerechnet.

3.11. Histologische Untersuchungen

Lungen, die histologisch untersucht werden sollten, wurden sofort nach dem betreffenden Versuchsabschnitt mit 1o ml gepufferter 4% Formalinlösung instilliert und in einem mit gepufferter Formalinlösung gefüllten Gefäß aufbewahrt. Aus verschiedenen Lungenabschnitten wurden Schnitte angefertigt, die mit Elastica-van Gieson, Giemsa und PAS (Perjodsäure-Schiff-Reaktion) angefärbt wurden.

3.12. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für Dünnschnitte wurden die Proben 1 Stunde bei 0°C mit o,5% OsO_4 und 1,25% Glutaraldehyd in o,o5M Cacodylat Puffer (pH 6,8) fixiert.

Danach wurden die Proben in 1% Agar eingebettet. Die Schnitte wurden mit Bleizitrat gefärbt. Alle Proben wurden bei 6o KV mit einem Philips EM 2o1-Elektronenmikroskop untersucht.

3.13. Statistische Methoden

Die Versuchsgruppen isolierter Lungen mit gespültem und ungespültem kleinen Kreislauf wurden bezüglich der Meßkriterien Volumen bei 5 cm H_2O, Präparatgewicht und Stabilitätsindex mit einem rangierten WILCOXON-Test für unabhängige Stichproben verglichen.
Derselbe Test wurde benutzt,um die Effizienz der unterschiedlichen alveolären Spülverfahren zu erfassen. Als Meßkriterien diente das Volumen bei 5 cm H_2O und die Menge der in der Lunge verbliebenen Spülflüssigkeit.
Der WILCOXON-Test für unabhängige Stichproben ist verteilungsfrei, die Stichprobenumfänge n_1 und n_2 müssen 4 sein.
Die Anzahl der Bindungen zwischen n_1 und n_2 darf nicht größer als 25% sein. Das Signifikanzniveau wurde auf o,o5 festgelegt.
Da es für Prozentangaben von Ausgangswerten keinen statistischen Test gibt (48, 57) wurde als Meßkriterium nicht der sonst angegebene Prozentsatz der Lungentotalkapazität bei 5 cm H_2O, sondern das Volumen bei 5 cm H_2O verwandt.
Die Werte des WILCOXON-Testes wurden den Wissenschaftlichen Tabellen GEIGY entnommen (14).

4. VERSUCHE MIT ISOLIERTEN KANINCHENLUNGEN

Die Versuche an isolierten Kaninchenlungen wurden mit der für isolierte Rattenlungen beschriebenen Technik durchgeführt. In den Versuchen wurden die Lungen von acht männlichen, 2,5 kg schweren Kaninchen verwandt. Dabei erwies sich das Lungengewebe dieser Tiere als sehr verletzlich. Wie Tab. 3 zeigt, konnten nur in einem Versuch die isolierten Lungen so gespült werden, daß anschließend die Aufzeichnung eines weiteren Druck(P)-Volumen(V) Diagramms (D) möglich war. Allerdings ergab sich in diesem Fall

keine Veränderung der Druck-Volumen Kurve, so daß ein Erfolg des Spülens nicht nachweisbar war. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Versuche mit isolierten Rattenlungen weitergeführt.

Tab. 3:

Kaninchen Nr.	Präparation	1. P-V D	Spülung d. Lunge	2. P-V D
1.	Verletzung der Lunge	-	-	-
2.		-	-	-
3.	+	Leck bei einem Druck von 21 cm H_2O	-	-
4.	+		-	-
5.	+	+	bei der Spülung trat ein Defekt auf	-
6.	+	+		-
7.	+	+		-
8.	+	+	mit 1oo ml Ringerlösung	keine Veränderung gegenüber 1. P-V D

5. ERGEBNISSE

5.1. Versuche mit isolierten Rattenlungen

Tab. 4 gibt Aufschluß über die Verwendung der isolierten Rattenlungen. Nach Abzug der Vorversuche wurden 56 Versuche durchgeführt, wobei in 1o Fällen (= 18%) Lecks in der Lunge auftraten die zum Abbruch des betreffenden Versuchs führten.

Tab. 4:

Gesamtzahl der isolierten Rattenlungen	68
Verwendung zu	
- Vorversuchen	12
- histologische Untersuchungen	4
- photographische Dokumentation	2
- Aufzeichnung von Druck-Volumen Diagrammen	4o
davon defekt	
- nach Präparation	4
- nach Spülung	6

5.2. Spülung des kleinen Kreislaufs

Die Gewichte zwischen den Präparaten, bei denen der kleine Kreislauf gespült wurde und denen ohne Spülung waren unterschiedlich (P = o,o5).

Tab. 5: Vergleich von Präparatgewicht und der in den Luftwegen verbliebenen Flüssigkeit nach alveolärer Spülung bei ungespültem und gespültem kleinen Kreislauf. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

	kleiner Kreislauf ungespült (n = 6)	kleiner Kreislauf gespült (n = 9)
Präparatgewicht (g)	6,8 ± o,4	5,4 ± o,5
verbliebene Flüssigkeit (g)	4,3 ± o,4	3,8 ± o,9

Auch im Verhalten der isolierten Lungen bei sieben aufeinanderfolgenden Druck-Volumen Diagrammen zeigten sich signifikante Unterschiede (p = o,1) im 3. - 5. Diagramm. Wie aus Abb. 3 zu erkennen ist, hatten Lungen mit gespültem kleinen Kreislauf ein deutlich instabileres Verhalten. Dieser Unterschied ergab sich sowohl nach dem Beurteilungsverfahren von RÖFER (75) als auch nach dem von IKEGAMI (43).

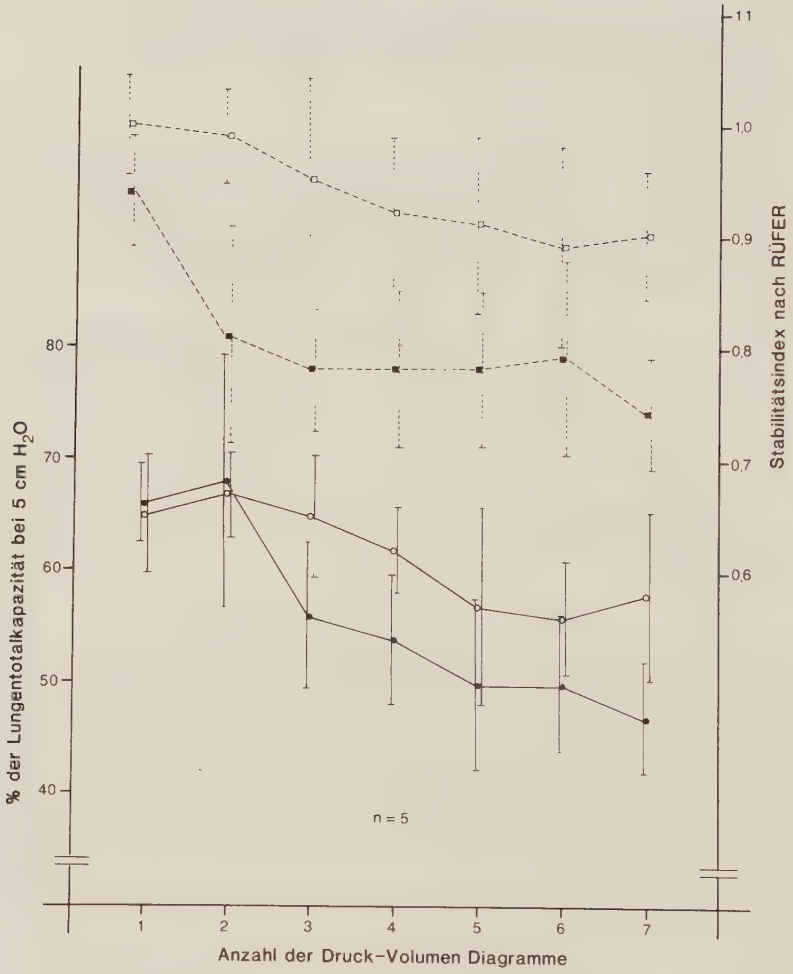


Abb. 3: Veränderung der Lungenstabilität in Abhängigkeit von der Zahl der Druck-Volumen Diagramme und der Spülung des kleinen Kreislaufs. Durchgezogene Linie = Berechnung nach IKEGAMI (44), gestrichelte Linie = Stabilitätsindex nach RÜFER (75). Gefüllte Punkte = gespülter kleiner Kreislauf, ungefüllte Punkte = ungespülter kleiner Kreislauf. Werte in Tab. 6.

Tab. 6: Stabilitätsindices nach ROFER (R) und IKEGAMI (I) bei einer Versuchsreihe mit jeweils 7 aufeinanderfolgenden Druck-Volumen Diagrammen

a) ohne Spülung des kleinen Kreislaufes

Nummer		13		14		16		17		18	
		I	R	I	R	I	R	I	R	I	R
Diagramm	a	61	1.o3	72	1,o6	61	o,94	69	1,o	61	o,97
	b	74	1,o4	72	1,o4	65	o,94	65	o,97	59	o,96
	c	7o	1,o1	71	1,o4	6o	o,96	66	o,96	58	o,8o
	d	65	o,96	66	o,99	63	o,94	61	o,92	56	o,81
	e	65	o,94	62	o,97	59	o,92	6o	o,95	4o	o,78
	f	-	-	62	o,97	59	o,93	58	o,88	43	o,77
	g	-	-	69	o,92	59	o,94	55	o,92	47	o,9o

b) mit Spülung des kleinen Kreislaufes

Nummer		2o		21		22		23		24	
		I	R	I	R	I	R	I	R	I	R
Diagramm	a	7o	o,99	66	o,96	62	o,86	7o	1,o	64	o,91
	b	85	o,98	67	o,74	65	o,72	75	1,o	48	o,6o
	c	63	o,93	57	o,74	46	o,61	6o	o,86	53	o,75
	d	62	o,94	57	o,7o	44	o,6o	56	o,86	53	o,78
	e	57	o,87	43	o,66	41	o,67	56	o,87	55	o,81
	f	56	o,94	41	o,61	48	o,75	53	o,81	54	o,83
	g	-	-	42	o,62	43	o,63	53	o,86	49	o,8o

Bei der histologischen Untersuchung der Lungen mit gespülten kleinen Kreislauf ergab sich, daß das meiste Blut aus den Lungen entfernt war (Abb. 4 u. 5)

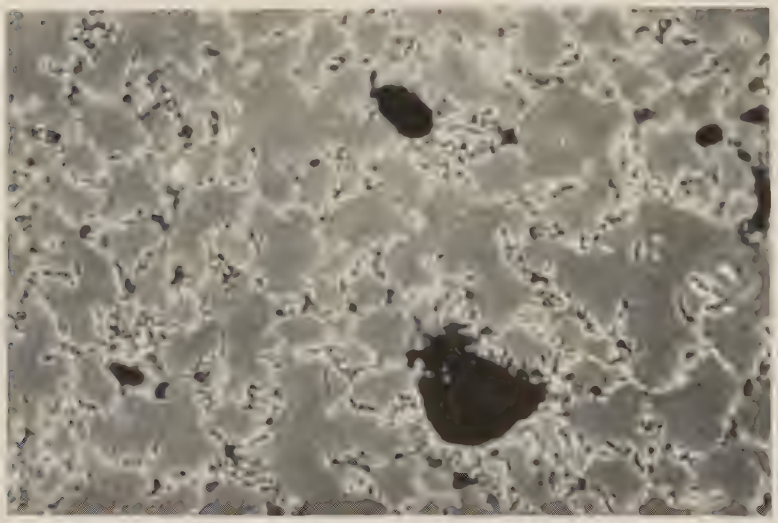


Abb. 4: Lunge ohne Spülung der Pulmonalgefäße (Vergrößerung 2oo-fach)

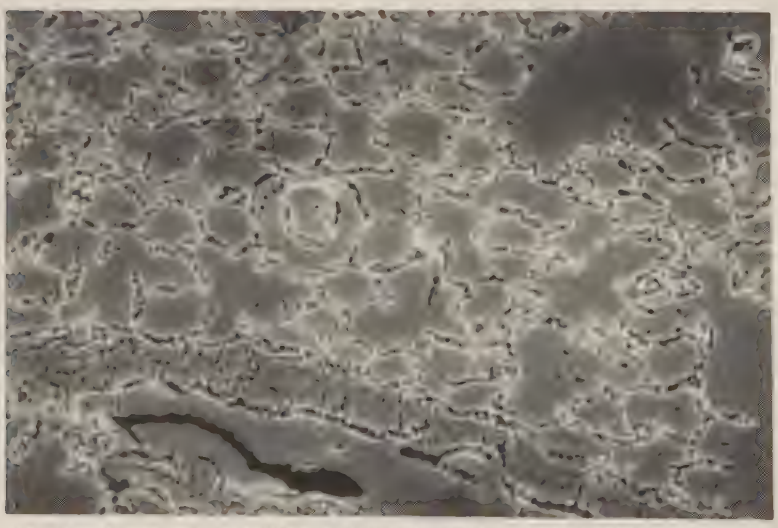


Abb. 5: Lunge mit gespülten Pulmonalgefäßen. Geringe Blutreste sind erkennbar (Vergrößerung 2oo-fach)

Demgegenüber zeigten sich keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen bei der nach Spülung der Lungen in den Alveolren verbleibenden Flüssigkeitsmenge. Ebenso ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede bei den Druck-Volumen Diagrammen nach alveolärer Spülung (Tab. 7).

Tab. 7: Druck-Volumen-Relation isolierter Rattenlungen vor und nach alveolärer Spülung der Lungen. Angegeben ist jeweils das inspiratorische Volumen bei 25 cm H_2O, das exspiratorische Volumen bei 5 cm H_2O, sowie der exspiratorische Prozentsatz der Lungentotalkapazität bei 5 cm H_2O

a) ohne Spülung des kleinen Kreislaufes

Nr.	ungespült			gespült		
	25 cm H_2O (ml)	5 cm H_2O (ml)	%	25 cm H_2O (ml)	5 cm H_2O (ml)	%
1o	15,2	1o,o	66	12,o	4,2	35
12	18,o	12,7	71	13,2	5,5	42
13	13,2	8,o	61	14,8	4,o	27
14	17,9	12,8	72	13,1	3,7	28
16	14,o	8,6	61	13,2	5,3	4o
17	18,o	12,5	69	14,7	5,5	37

b) mit Spülung des kleinen Kreislaufes

Nr.	ungespült			gespült		
	25 cm H_2O (ml)	5 cm H_2O (ml)	%	25 cm H_2O (ml)	5 cm H_2O (ml)	%
2o	18,2	12,8	7o	19,4	6	3o
21	18,5	12,3	66	15,5	3,3	21
24	18,4	11,8	64	18,3	3,1	17
31	18,3	12,6	69	13,3	6,6	5o
35	2o,o	13,o	65	15,7	4,9	31
36	16,1	12,3	76	12,1	5,o	41
37	14,3	9,5	67	13,8	4,8	35
39	17,3	1o,8	62	15,3	5,3	35
4o	14,8	1o,1	68	11,o	3,8	35
41	15,o	8,8	59	13,2	4,1	31

5.3. Spülmethodik

Um das beste Spülverfahren herauszufinden mit dem der Surfactant aus der isolierten Rattenlunge entfernt werden konnte, wurden zwei unterschiedliche Techniken angewandt und deren Ergebnisse miteinander verglichen.

5.3.1. Vergleich der verbleibenden Spülflüssigkeit

Die Menge der in der Lunge verbliebenen Spülflüssigkeit konnte durch Wiegen der Präparate vor und nach der Spülung genau ermittelt werden. Wenn bei jedem einzelnen Spülvorgang die Spülflüssigkeit zweimal in die Lunge instilliert und wieder abgezogen wurde, verblieb signifikant weniger ($p = o,o5$) Flüssigkeit in der Lunge, als bei nur einmaligem Instillieren und Abziehen.

	einmalige Instillation derselben Flüssigkeit	zweimalige Instillation derselben Flüssigkeit
verbliebene Flüssigkeit	4,3 ml ($\pm$ o,4) n = 16	3,1 ml ($\pm$ o,4) n = 24

5.3.2. Durch Spülung entfernte Phosphormenge

Die Spülflüssigkeit jeweils zweier aufeinanderfolgender Spülvorgänge wurde gepoolt, die Lipide extrahiert und eine Phosphorbestimmung durchgeführt. Wie aus Abb. 6 hervorgeht, fällt der Phosphorgehalt in der Spülflüssigkeit bei der Methode der zweimaligen Instillation sehr viel rascher ab als nach einmaliger Instillation. Die entfernte Gesamtpospholipidmenge war bei beiden Methoden mit 2 mg pro gespülter Lunge gleich.

5.3.3. Unterschiede in den Druck-Volumen Diagrammen

Bei nur einmaligem Instillieren zeigte sich, daß 69% der Lungen (11 von 16) nicht ausreichend gespült waren und daher aus dem

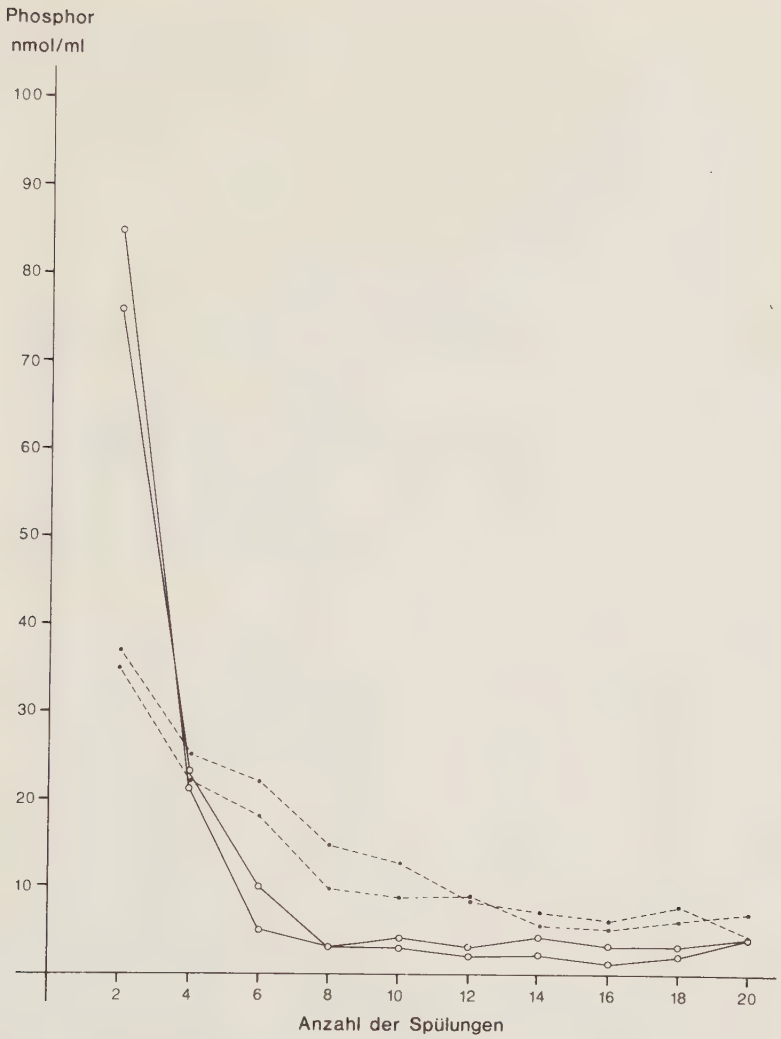


Abb. 6: Abnahme des Phosphorgehaltes in der Spülflüssigkeit bei 2o aufeinanderfolgenden Spülungen. Je zwei Spülungen wurden zur Phosphorbestimmung gepoolt. Durchgezogene Linie = zweimaliges Hin- und Herspülen. Gestrichelte Linie = einmaliges Instillieren.

Versuch genommen werden mussten, während bei zweimaligem Instillieren alle Lungen ausreichend gespült waren. Auch die statistische Auswertung ergab, daß die Lungenvolumina bei 5 cm H_2O nach zweimaliger Instillation signifikant kleiner waren ($p = o,o5$). (Einzeldaten siehe Tab. 7 a) und b) für Nr. 1o - 41, sowie Tab. 9 für Nr. 43 - 68).

5.3.4. Einfluß der Menge der Spülflüssigkeit

Abb. 7 und Tab. 8 zeigen die Abnahme des Lungenvolumens bei einem Druck von 5 cm H_2O abhängig von der Menge der Spülflüssigkeit.

Tab. 8: Zusammenhang von alveolärer Spülmenge und Veränderung des Druck-Volumen Diagramms. % = Prozent der Lungentotalkapazität bei 5 cm H_2O

Nr.	Spülmenge (ml)	Lungenvolumen (ml) bei 25 cm H_2O	Lungenvolumen (ml) bei 5 cm H_2O	%
1	3o	11,2	6,4	57
3	6o	11,8	6,2	53
4	7o	12,8	6,5	51
5	8o	14,5	7,o	48
32	1oo	15,3	8,1	53
1o	17o	12,o	4,2	35
13	17o	14,8	4,o	27
12	18o	13,2	5,5	42
14	18o	13,1	3,7	28
21	2oo	15,5	3,3	21

5.3.5 Histologische Untersuchungen

Bei der histologischen Untersuchung von gespülten Lungen waren im Alveolarbereich keine Veränderungen gegenüber ungespülten Lungen zu erkennen (Abb. 8 u. 9).

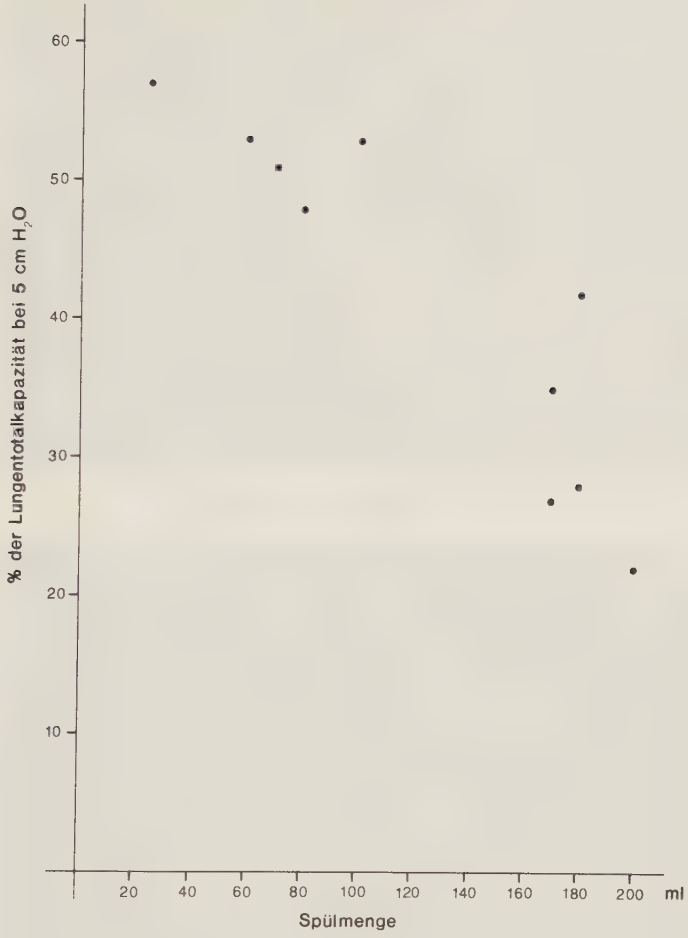


Abb. 7: Zusammenhang zwischen Spülmenge und Veränderung des Druck-Volumen Diagramms.

Abb. 8: Ungespülte Lunge (Vergrößerung: 2oo-fach)

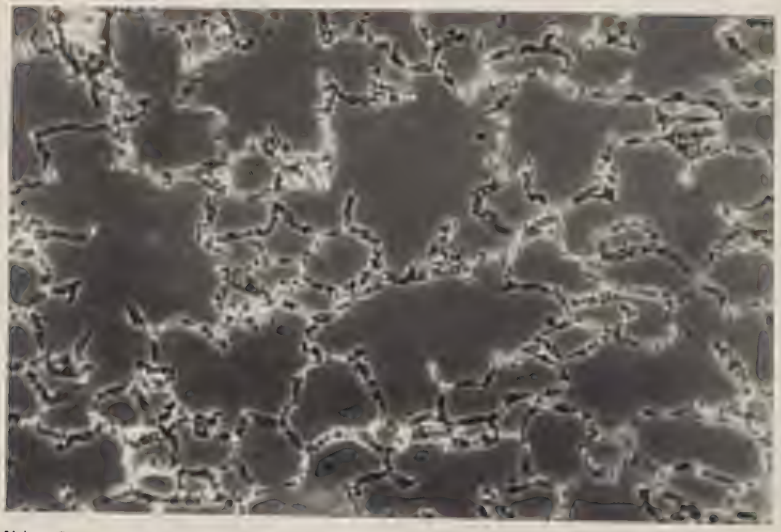


Abb. 9: Lunge nach 2o Spülungen (zweimaliges Hin- und Herspülen) (Vergrößerung: 2oo-fach)

5.3.6. Untersuchung der Spülflüssigkeit

Auf der Wilhelmywaage sank die Oberflächenspannung der Spülflüssigkeit bei Kompression auf 6 mN/m (Abb. 1o).

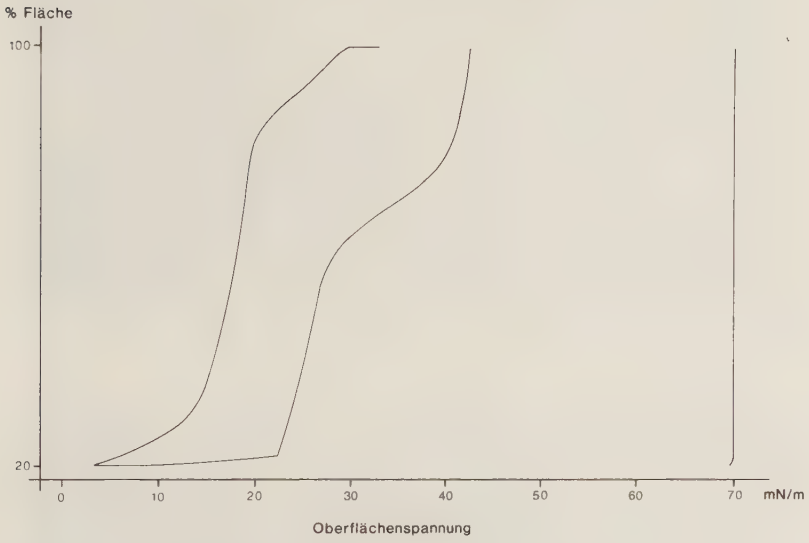


Abb. 1o: Oberflächenspannungsdiagramm der gesamten Spülflüssigkeit

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Spülflüssigkeit zeigte eine große Anzahl unterschiedlicher Bestandteile (Abb. 11 u. 12). Neben vielen Erythrozyten fanden sich Makrophagen, Alveolarzellen Typ II mit osmophilen Einschlußkörpern (lamellar bodies) und sogenannte Myelinstrukturen.

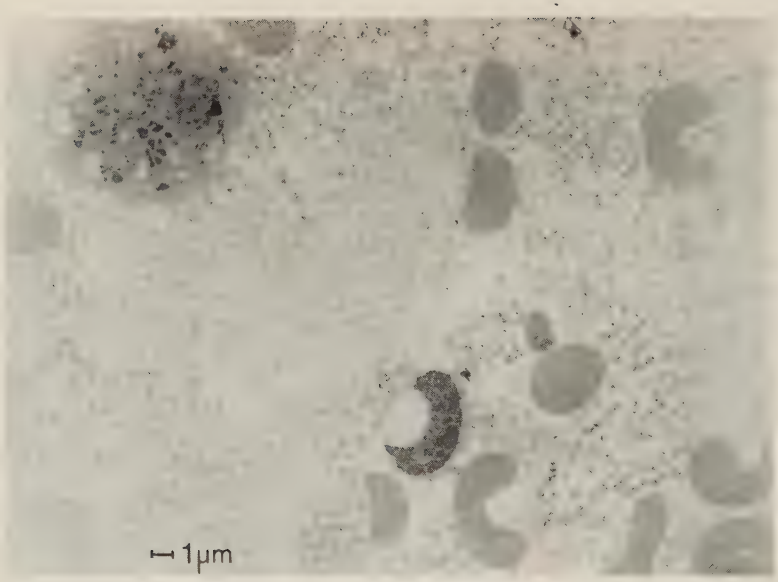


Abb. 11: Elektronenmikroskopische Aufnahme (4ooo-fach) der Spülflüssigkeit. Links oben alveolärer Makrophage.

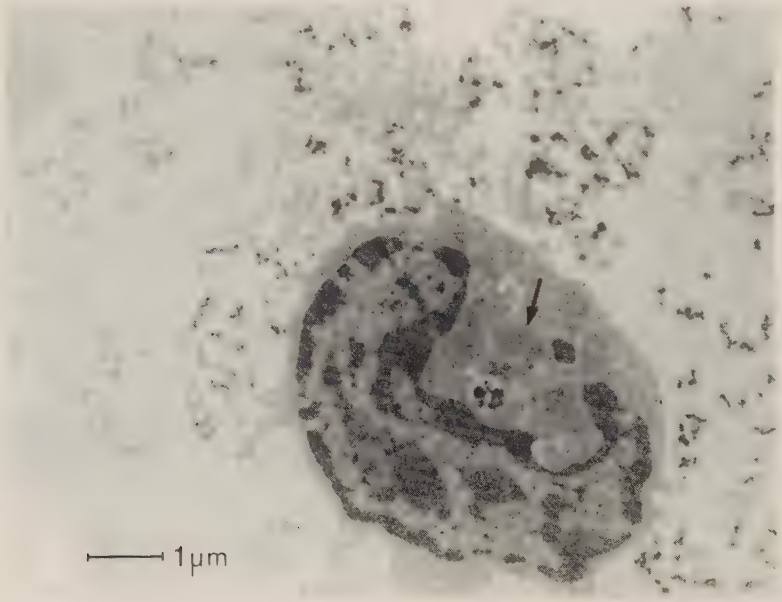


Abb. 12: Elektronenmikroskopische Aufnahme (14ooo-fach), zeigt Alveolarzelle Typ II mit lamellar bodies (Pfeil).

5.4. Substitution der gespülten Lunge

Abb. 13 zeigt die unterschiedlichen Druck-Volumen Diagramme derselben Lunge vor Spülung, nach alveolärer Spülung und nach Substitution mit natürlichem Surfactant.

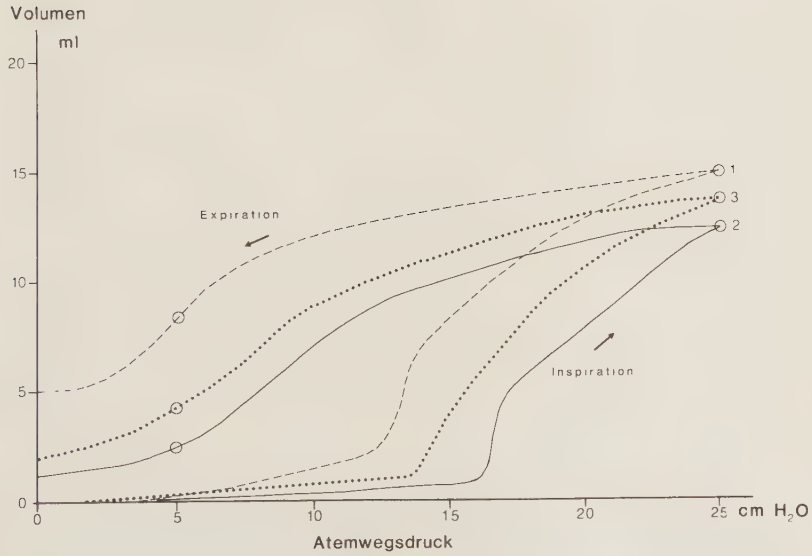
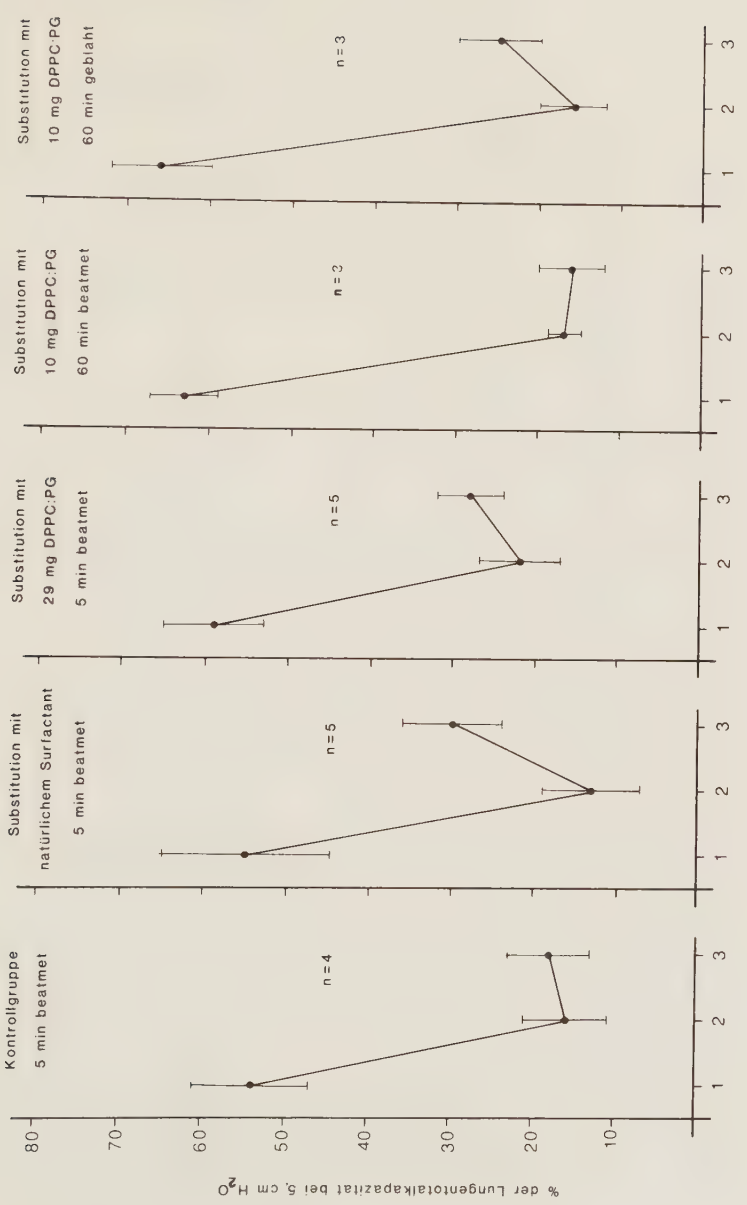


Abb. 13: Druck-Volumen Diagramm einer isolierten Rattenlunge.
1 = ungespült; 2 = alveolär gespült; 3 = substituiert mit natürlichem Surfactant.

Die alveolär gespülte Lunge wurde mit unterschiedlichen Substanzen in unterschiedlicher Dosierung substituiert. Die Ergebnisse zeigt die Tab. 9 und die Abb. 14. Die besten Resultate erzielte der natürliche Surfactant (Dosis: 2o mg Gesamtphospholipide), bei dem sich mehr als eine Verdoppelung des Lungenvolumens bei 5 cm H_2O (von 13% auf 3o%) ergab. Auch bei der Substitution von 29 mg DPPC:PG im Verhältnis 9:1 kam es zu einer leichten Erhöhung des Lungenvolumens (von 22% auf 28%). Demgegenüber zeigte sich bei der Substitution von 12 mg DPPC:PG (9:1) und 6o-minütiger Beatmung keinerlei Veränderung, während sich bei derselben Menge eine leichte Verbesserung (von 16% auf 25%) ergab, wenn die Lunge über 6o Minuten mit einem konstanten Druck von 15 cm H_2O gebläht wurde.

Abb. 14, S. 33: Substitution mit unterschiedlichen Surfactantpräparationen. 1 = Lunge ungespült, 2 = Lunge alveolär gespült, 3 = nach Substitution.


% der Lungentotalkapazität bei 5 cm H_2O
80
70
60
50
40
30
20
10
Kontrollgruppe
5 min beatmet
n=4
Substitution mit
natürlichem Surfactant
5 min beatmet
n=5
Substitution mit
29 mg DPPC:PG
5 min beatmet
n=5
Substitution mit
10 mg DPPC:PG
60 min beatmet
n=3
Substitution mit
10 mg DPPC:PG
60 min gebiaht
n=3
1
2
3

Tab. 9: Druck-Volumen Beziehungen von isolierten Rattenlungen vor und nach alveolärer Spülung der Lungen, sowie nach Substitution mit natürlichem oder künstlichem Surfactant. Bei den Kontrollen erfolgte keine Substitution, aber ebenfalls 5 Minuten Beatmung.

Angegeben ist jeweils das inspiratorische Volumen (bei 25 cm H_2O), das exspiratorische Volumen (bei 5 cm H_2O), sowie der exspiratorische Prozentsatz der Lungentotalkapazität

Art der Substitution	Nr.	ungespült			gespült			substituiert		
		25 cm H_2O (ml)	5 cm H_2O (ml)	%	25 cm H_2O (ml)	5 cm H_2O (ml)	%	25 cm H_2O (ml)	5 cm H_2O (ml)	%
Kontrollen	65	15,5	7,5	48	12,1	2,6	21	8,8	1,3	15
	66	13,1	6,4	49	9,3	0,9	10	10,0	1,4	14
	67	16,3	9,9	61	13,5	2,5	19	12,9	3,1	24
	68	15,4	8,8	57	14,8	1,8	12	14,8	2,8	19
natürlicher Surfactant	42	16,8	5,4	32	14,1	3,3	23	10,6	3,8	36
	46	18,0	10,2	57	16,0	1,6	10	16,0	6,7	47
	61	13,3	8,3	62	14,3	1,9	13	12,6	3,9	31
	62	17,5	10,6	61	16,4	1,7	10	14,1	2,7	24
	63	15,6	9,8	63	14,4	1,4	10	14,1	2,7	19

Fortsetzung Tab. 9

DPPC:PG 9:1	55	17,5	10,5	60	17,1	5	29	15,8	5,0	32
29 mg	56	15,0	8,6	57	12,5	2,6	21	13,7	4,4	32
	57	15,8	10,9	69	15,9	3,8	24	15,1	4,4	29
	58	16,3	9,4	58	14,9	3,1	21	14,1	3,1	22
	60	13,8	7,3	53	15,9	2,3	14	15,3	3,8	25
DPPC:PG 9:1	51	19,0	11,2	59	15,3	2,9	19	15,1	2,6	17
12 mg	52	15,5	9,9	64	13,7	2,4	18	12,3	1,3	11
	53	14,4	9,5	68	12,6	1,9	15	12,3	2,4	20
DPPC:PG 9:1	43	14,1	9,9	70	13,8	2,8	20	13,5	3,8	28
12 mg	47	18,3	12,8	70	17,3	2,5	15	17,4	5,6	32
	48	18,0	10,5	58	15,3	2,0	13	15,6	2,4	15

Nr. 51 - 53 wurden 6o Minuten beatmet, Nr. 43, 47, 48 wurden 6o Minuten gebläht

5.5. Prüfung der Substitute auf der Wilhelmywaage

Alle Substanzen wurden vor Substitution auf der Wilhelmywaage auf ihre Fähigkeit getestet, bei Kompression die Oberflächenspannung zu senken. Tab. 10 zeigt die Werte für die gesamte Spülflüssigkeit, den natürlichen Surfactant und für DPPC:PG (9:1). Bei DPPC+PG sank die Oberflächenspannung bei Kompression in allen Fällen auf 0 mN/m, bei natürlichem Surfactant dagegen nie unter 10 mN/m.

Tab. 10: Untersuchung dynamischer Oberflächenspannung der gesamten Spülflüssigkeit, des natürlichen Surfactant, sowie aller künstlichen Substitute auf der Wilhelmywaage.

Oberflächenspannung	γ min (mN/m)	γ max (mN/m)
gesamte Spülflüssigkeit	6	36
natürlicher Surfactant	12	25
	14	27
DPPC:PG 9:1	0	61
	0	57
	0	37
	0	63
	0	51

Um eventuelle Veränderungen des Substitutes in der alveolär gespülten Lunge erfassen zu können, wurde eine mit DPPC+PG substituierte Lunge nach Beatmung und Aufzeichnung eines Druck-Volumen Diagramms erneut gespült. Von dieser Spülflüssigkeit wurden 10 ml ohne weitere Behandlung direkt auf der Wilhelmywaage untersucht, die restliche Flüssigkeit 60 min. bei 4°C mit 3000 x g zentrifugiert. Das Pellet senkte die Oberflächenspannung, wie das ursprüngliche Substitut, auf 0 mN/m.(Tab. 11).

Tab. 11: Untersuchung der dynamischen Oberflächenspannung von gesamter Spülflüssigkeit und Pellet einer nach Substitution mit DPPC:PG erneut gespülten Lunge.

Oberflächenspannung	γ min (mN/m)	γ max (mN/m)
gesamte Spülflüssigkeit	17	53
Pellet	0	56
	0	56

Abb. 15 zeigt die Oberflächendiagramme von natürlichem Surfactant, von DPPC:PG (9:1) und des Pellets der nach Substitution von DPPC:PG gewonnenen Spülflüssigkeit.

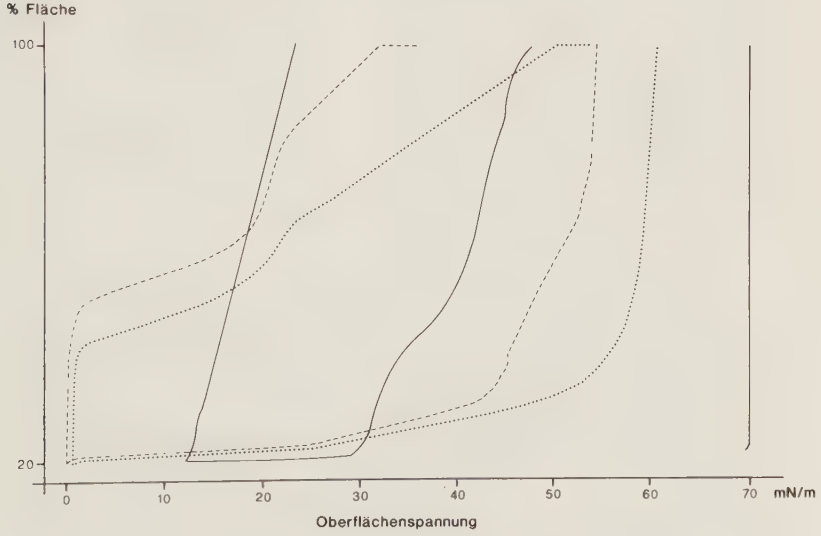


Abb. 15: Oberflächenspannungsdiagramm von natürlichem Surfactant (durchgezogene Linie), DPPC:PG 9:1 (gestrichelte Linie) und dem Pellet der Spülflüssigkeit nach Substitution (gepunktete Linie).

5.6. Dünnschichtchromatographie und Phosphorbestimmung

Die Abb. 16 + 17 zeigen die Chromatogramme von Überstand und Pellet der Spülflüssigkeit einer Lungenspülung. Während sich aus den Chromatogrammen kein Unterschied in der Phospholipidzusammensetzung in den beiden Fraktionen ablesen läßt, ergab die Phosphorbestimmung ein Mengenverhältnis von 14:1 zwischen Pellet und Überstand.

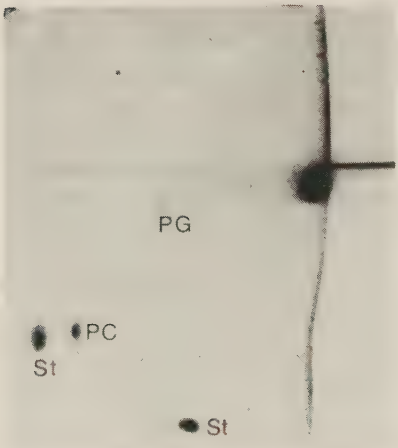


Abb. 16: Chromatogramm vom Überstand der Spülflüssigkeit nach Zentrifugation

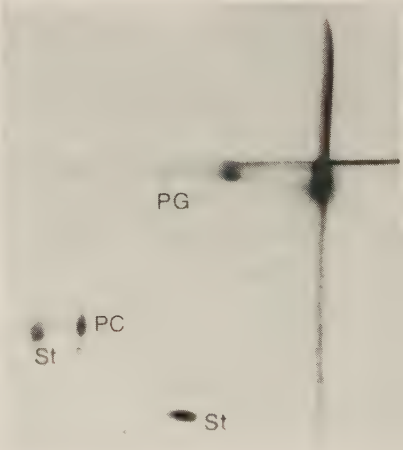


Abb. 17: Chromatogramm vom Pellet der Spülflüssigkeit nach Zentrifugation

(St = Standard, PC = Phosphatidylcholin, PG = Phosphatidylglycerol)

Die Abb. 18 zeigt das Chromatogramm des Pellets,das aus der Spülflüssigkeit nach Substitution von DPPC:PG gewonnen wurde. Deutlich erkennbar die großen Phospholipidflecken von PC und PG, während die anderen Phospholipide kaum noch in Erscheinung treten. Die Phosphorbestimmung aus beiden Flecken ergab allerdings nur noch ein Verhältnis von 4:1 zwischen PC und PG.

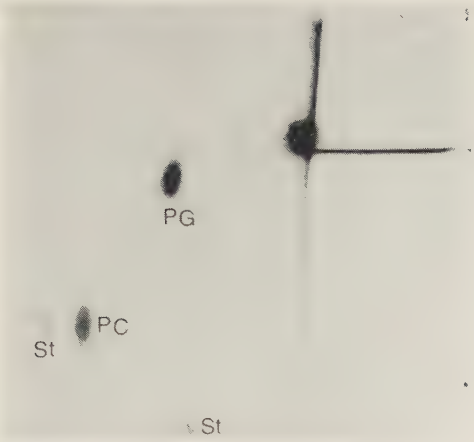


Abb. 18: Chromatogramm des Pellets der Spülflüssigkeit nach Substitution. Deutlich erkennbar die großen Flecke von PC und PG.

(St = Standard, PC = Phosphatidylcholin, PG = Phosphatidylglycerol)

5.7. Elektronenmikroskopisches Erscheinungsbild des natürlichen Surfactant.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung zeigte, daß der nach dem oben beschriebenen Verfahren hergestellte, natürliche Surfactant noch Zellen enthält, darunter sehr viele Makrophagen (Abb. 19). Die Ausschnittvergrößerung zeigt, daß in den Makrophagen einige multilamelläre Vesikel eingeschlossen sind (Abb. 2o).

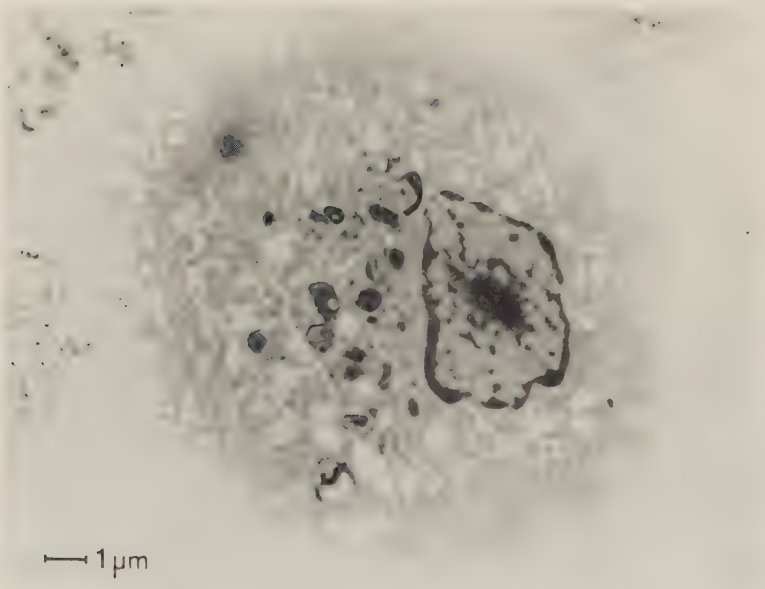


Abb. 19: Alveolarmakrophage aus dem natürlichen Surfactant (Vergrößerung 9ooo-fach)

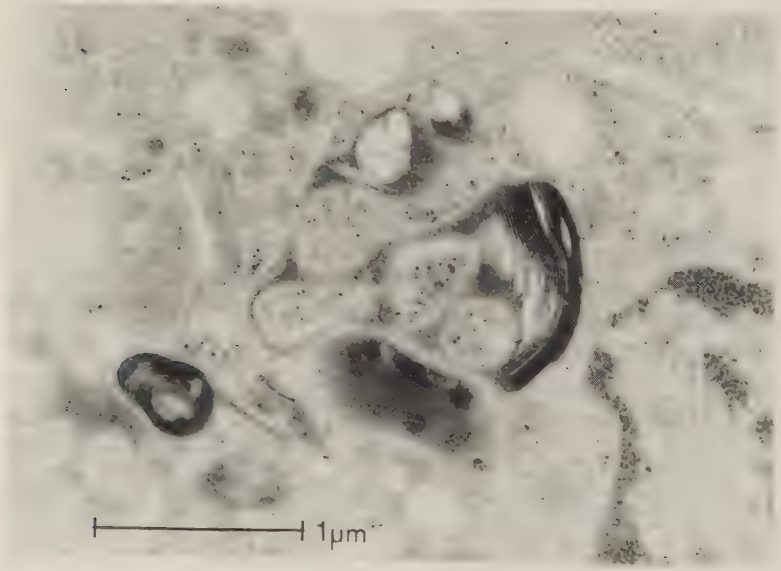


Abb. 2o: Ausschnitt aus Abb. 2o. Deutlich erkennbar zwei multilamelläre Vesikel. (Vergrößerung 4oooo-fach).

5.8. Time-Base Versuche

Abb. 21 zeigt den Kurvenverlauf bei plötzlicher Druckentlastung des Systems. Deutlich erkennbar der stark verlangsamte Druckabfall nach Entfernung des Surfactant. Tab. 12 gibt die Druckwerte für ungespülte und gespülte Lungen nach o,5 sek. und 1 sek. an.

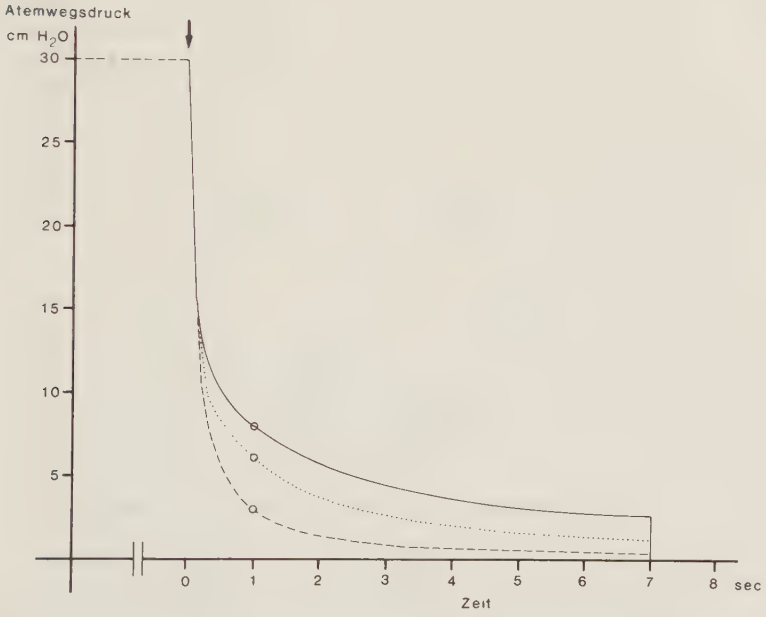


Abb. 21: Diagramme eines Time-Base Versuches. Am Pfeil erfolgt die Druckentlastung. Gestrichelte Linie = ungespült, durchgezogene Linie = gespült, gepunktete Linie = nach Substitution mit natürlichem Surfactant.

Tab. 12: Druckwerte bei den Time-Base Versuchen. Angegeben sind die Werte 0,5 und 1 Sekunde nach Druckentlastung des Systems.

Nr.	Druck (cm H_2O) nach 0,5 sec.		Druck (cm H_2O) nach 1 sec.	
	ungespült	gespült	ungespült	gespült
43	6,2	1o,2	3,o	7,8
44	6,2	9,9	3,9	7,7
45	5,6	8,8	3,7	6,8

6. METHODENDISKUSSION

6.1. Vergleich des eigenen Versuchaufbaus mit anderen Verfahren

6.1.1. Methode nach RÖFER (75)

Eine Infusionspumpe drückt mit kontinuierlicher Geschwindigkeit von 2 ml/min. Luft in die isolierte Lunge. Über ein Y-Stück ist ein elektromagnetischer Druckaufnehmer mit diesem System verbunden. Druck- und Volumenänderungen werden kontinuierlich erfaßt und mit Hilfe eines X-Y-Schreibers direkt ein Druck-Volumen Diagramm aufgezeichnet. Dieser Versuchsaufbau wurde der vorliegenden Arbeit zugrunde gelegt, musste aber ergänzt werden, da die Versuche bei hoher Luftfeuchtigkeit und Körpertemperatur durchgeführt werden sollten. Auch die Beatmungsmöglichkeit musste neu entwickelt werden.

6.1.2. Methoden nach FRAZER (26)

Die Lungen befinden sich in einem luftgefüllten Plethysmograph, der von einem temperierbaren Wasserbad umgeben ist. Über eine Infusionspumpe mit einem parallelgeschalteten Druckaufnehmer wird die Luft kontinuierlich in die Lunge hineingedrückt und wieder abgezogen. Die Volumenänderungen werden über ein Spirometer erfaßt. Druck- und Volumenänderungen werden direkt mit einem X-Y-Schreiber aufgezeichnet.

Der Nachteil dieser Methode besteht in der indirekten Methode der Erfassung der Volumenänderung durch ein Spirometer. Bedingt durch die Kompressibilität der Luft kommt ein großer methodischer Fehler in diesen Versuchsaufbau.
Eine andere Methode von FRAZER (25) schaltet diesen Fehler aus. Die Lunge befindet sich in einem vollständig mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllten Plethysmographen und ist über die Trachealkanüle frei mit der Umgebungsluft verbunden. An den Plethysmographen ist eine Infusionspumpe und ein Druckaufnehmer angeschlossen. Durch Abpumpen der Kochsalzlösung werden die Lungen belüftet, durch Hineindrücken von Kochsalzlösung wieder entlüftet. Die Volumenänderungen werden mit Hilfe eines Wendelpotentiometers direkt an der Infusionspumpe erfaßt. Die Vorteile dieser Methodik sind die höhere Sensitivität (Kompressibilität der Luft fällt weg), geringere Gasdiffusion durch die Pleura und das rasche Entdecken kleiner Lecks in der Lunge. Nachteile sind allerdings eine Druckdifferenz zwischen Lungenspitze und Lungenbasis von 5 cm H_2O, bedingt durch den hydrostatischen Druck, sowie ein Flüssigkeitsaustausch zwischen Lunge und umgebender Flüssigkeit (19). Während der zweite Fehler durch eine isotonische Flüssigkeit kleingehalten werden kann, ist der erste Fehler so gravierend, daß dieser Versuchsaufbau in der vorliegenden Arbeit nicht angewandt werden konnte.

6.1.3. Methode nach GRIBETZ (38)

Von GRIBETZ als erstem beschrieben und seitdem von mehreren anderen Autoren modifiziert ebenfalls angewandt, dient diese Methode der diskontinuierlichen Aufzeichnung eines Druck-Volumen Diagramms. Ein mit Wasser und ein mit Luft gefülltes Gefäß sind hintereinander geschaltet. Durch Heben und Senken des mit Wasser gefüllten Gefäßes wird die Luft aus dem zweiten Gefäß verdrängt und in die Lunge hineingedrückt bzw. wieder abgezogen. Die Druckwerte werden von einem Wasser- oder Quecksilber-Manometer abgelesen. Bei festgelegten Volumenwerten wird 15 - 2o Sekunden abgewartet, bevor der Druck abgelesen wird. Der Nachteil dieser Methode besteht in der diskontinuierlichen Aufzeichnung des Druck-Volumen Diagramms und der durch Ablesefehler gefährdeten Erfassung der Werte.

Der in der vorliegenden Arbeit angewandte Versuchsaufbau vermeidet eine Anzahl der oben erwähnten methodischen Fehler. Die Aufzeichnung der Druck-Volumen Diagramme erfolgt im physiologischen Temperaturbereich von 36 - 37°C, die hohe Luftfeuchtigkeit verhindert einerseits das Austrocknen der Lungen während des Versuchs, andererseits den von FARIDY (19) beschriebenen Flüssigkeitsaustausch. Die kontinuierliche Aufzeichnung der Druck-Volumen Diagramme erlaubt einen besseren Einblick in das Lungenverhalten als die stufenweise Aufzeichnung. Durch den kleinen Durchmesser des Schlauchsystems wird der durch die Kompressibilität der Luft bedingte Fehler klein gehalten. Die automatische Aufzeichnung der Volumenänderung mit Hilfe des Wegaufnehmers und der Druckveränderung durch den Druckwandler vermeidet Ablesefehler.

6.2. Aufzeichnung von Druck-Volumen Diagrammen

6.2.1. Literaturüberblick

Ein Überlick über 3o Arbeiten zeigt, daß in 1o Fällen (2, 16, 18, 43, 44, 45, 63, 75, 76, 85) Druck-Volumen Diagramme aufgezeichnet wurden, um die Auswirkung einer Surfactantsubstitution erfassen zu können. Die anderen Arbeiten beschäftigen sich mit dem Phänomen des ˋAir-trappingˊ (25, 27, 28), mit den Auswirkungen der Beatmung auf den Surfactantgehalt (21, 93) und Auswirkungen anderer unterschiedlichster Faktoren auf das Dehnungsverhalten der Lunge.
Die angewandten Verfahren lassen sich alle auf die oben beschriebenen Methodiken zurückführen, wobei die Versuchsbedingungen jedoch sehr unterschiedlich sind. Vier Autoren (2, 25, 44, 6o) plazieren die Lunge in einem mit Kochsalzlösung gefüllten Gefäß, drei Autoren (6, 26, 86) versuchen durch eine hohe Luftfeuchtigkeit ein Austrocknen der isolierten Lunge zu verhindern. Das Belassen der Lungen in situ bei eröffnetem Thorax wird in 5 Arbeiten beschrieben (22, 39, 58, 79, 81), in einer weiteren (16) werden die Druck-Volumen Diagramme ohne vorherigen Pneumothorax aufgezeichnet. In allen anderen Arbeiten wird die Lunge aus dem Thorax entfernt.

Die wenigen Angaben über die Temperatur, bei der gearbeitet wurde, schwanken zwischen Raumtemperatur (21, 78, 93), 21°C (43) und 37°C (2, 44), wobei jedoch die Filmbildungsfähigkeit sehr stark temperaturabhängig ist. Ebenso gibt es nur wenige Arbeiten in denen über die Zeitdauer der Aufzeichnung (2, 43, 75), bzw. über die Geschwindigkeit (2, 25, 26, 58, 75, 86) Angaben gemacht werden. Die Aufzeichnungsgeschwindigkeiten schwanken zwischen 2 ml/min (75) und 5 ml/min (58).
Ebenso uneinheitlich sind die Maximaldrucke, bis zu denen die Lunge gebläht wird. Am häufigsten werden 3o cm H_2O (2, 21, 25, 26, 43, 44, 53, 78, 79, 86) angegeben, gefolgt von 4o cm H_2O (22, 51, 58, 81). In keiner Arbeit werden die unterschiedlichen Methoden gegeneinander abgewogen.

6.2.2. Präparation der isolierten Lunge

Vor der intraperitonealen Injektion wurden alle Ratten mit einer kurzen Ätherinhalationsnarkose betäubt. Eine eventuelle Beeinflussung des Surfactant durch Äther kann ausgeschlossen werden, da einerseits nur 2 ml verwendet wurden, andererseits Äther ein schlechtes Lösungsmittel für DPPC ist. Inhalationsnarkotika, die gleichzeitig gute Lösungsmittel für DPPC sind, wie Chloroform und Halothan, wurden daher nicht angewandt.
Die Tiere wurden mit einer intraperitonealen Injektion von Nembutal^R (12o mg/kg Körpergewicht) getötet, dies entspricht der oberen Grenze der in anderen Arbeiten (25, 44, 79, 86) angegebenen Menge.
Die Präparationsmethode ist der gängigen Methode, den Thorax direkt zu eröffnen (6, 43, 6o, 75, 79, 8o) überlegen, da die Gefahr einer Verletzung der Lunge geringer ist, wenn vor Eröffnen des Thorax unter Sicht von abdominal ein Pneumothorax gesetzt wird. Ein ähnliches Vorgehen wurde auch von FRAZER (25) und FARIDY (22) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit mussten 7% der Lungen (4 von 56) wegen einer Verletzung während der Präparation ausgeschieden werden. Dies ist im Vergleich zu den von SCARPELLI (81) angegebenen 2o - 3o% Verlust als sehr günstig anzusehen.
Eine Spülung des kleinen Kreislaufes wird von zwei Autoren beschrieben

(75, 87). In den meisten anderen Untersuchungen wird ein Ausbluten der Tiere durch Eröffnen der Abdominalaorta erreicht, wobei teilweise versucht wird, durch Heparinisieren des Blutes (19, 6o) eine bessere Wirkung zu erzielen. Eine weitgehende Entfernung des Blutes aus der isolierten Lunge ist notwendig, um die Beeinflussung des Druck-Volumen Diagramms durch die blutgefüllten Pulmonalgefäße (71) und den postmortalen Blutaustausch in den Alveolarraum ausschließen zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurden beide Methoden gegeneinander abgewogen, sowohl in Bezug auf die Veränderungen der Druck-Volumen Diagramme, als auch der Lungengewichte. Außerdem erfolgte eine histologische Kontrolle des Blutgehaltes der Gefäße. In der durchgesehenen Literatur sind keine derartigen Untersuchungen vorhanden, so daß die Ergebnisse nicht verglichen werden können.

6.2.3. Vorbehandeln der isolierten Lunge

Um die Druck-Volumen Diagramme unterschiedlicher Ratten miteinander vergleichen zu können, müssen alle Lungen dieselbe "Volumenvorgeschichte" haben. Unter "Volumenvorgeschichte" versteht man die Größe und Richtung der vorausgehenden Atembewegung (9o). Dabei kann zwischen zwei Verfahren unterschieden werden: Dem O_2-Absorptionsverfahren und dem Entlüften im Vakuum steht das kurzfristige Aufblähen mit einem standardisierten Druck gegenüber. Im O_2-Absorptionsverfahren wird der in der Lunge vorhandene Stickstoff durch eine Sauerstoffbeatmung `ausgewaschen´. Nach einer O_2-Beatmung von mindestens 1o min wird die Trachea abgeklemmt und abgewartet bis der Sauerstoff resorbiert ist. Anschliessend erhält man vollkommen atelektatische Lungen. Dieses Verfahren zeigt die besten Ergebnisse (25, 86), ist jedoch nur bei lebenden Tieren durchführbar.

Das Entlüften im Vakuum ist das am häufigsten angewandte Verfahren (2o, 26, 43, 53, 78, 93). Es hat den Vorteil, daß es auch an der isolierten Lunge mehrmals durchgeführt werden kann. Es ist allerdings nicht so wirksam wie das O_2-Absorptionsverfahren (86). In der Lunge

gefangene Luft, bedingt durch den "Air-trapping" Mechanismus, kann durch dieses Verfahren nicht entfernt werden (27, 71). Außerdem steigt durch die hohen negativen Drucke (bis - 2oo mm Hg) das Verletzungsrisiko der Lungen an. Das einfachste Verfahren ist das kurzfristige Blähen der Lungen mit einem Druck von 3o cm H_2O (75, 79). Dadurch erhalten alle Lungen dieselbe "Volumen-Vorgeschichte" und sind dann untereinander vergleichbar. Der Nachteil besteht darin, daß das Verfahren im Vergleich zu den obengenannten weniger gut standardisierbar ist.
Sollen die Druck-Volumen Diagramme atelektatischer und vorgeblähter Lungen miteinander verglichen werden, ergeben sich Schwierigkeiten, da atelektatische Lungen ein anderes Druck-Volumen Diagramm während der Inspirationsphase zeigen. Luftleere Lungen haben im Gegensatz zu vorgeblähten einen minimalen Öffnungsdruck (25, 75). Dieser ist abhängig vom Radius der terminalen Bronchioli und beträgt bei Ratten 16 - 18 cm H_2O (71). Im weiteren Verlauf der Inspirationsphase zeigen die Druck-Volumen Diagramme einen sehr unregelmäßigen Anstieg (71) und makroskopisch wechseln atelektatische und geblähte Lungenbezirke miteinander ab. Um einen vollkommenen Druckausgleich über die ganze Lunge zu erzielen, werden bei einer vorher atelektatischen Lunge 2o - 3o Minuten benötigt (71). In der vorliegenden Untersuchung stand dieser Zeitraum jedoch nicht zur Verfügung.

6.2.4. Aufzeichnung des Druck-Volumen Diagramms

Es kann zwischen statistischen und dynamischen Druck-Volumen Diagrammen unterschieden werden. Aus den statistischen Diagrammen erhält man Informationen über die elastischen Eigenschaften der Lunge (9o), die sich nach RADFORD (71) aus folgenden Komponenten zusammensetzen: Gewebselastizität, Oberflächenspannung an der Luft-Wasser-Grenzfläche und Blutfüllung der Pulmonalgefäße. Das dynamische Druck-Volumen Diagramm gibt Auskunft über Strömungswiderstände in der Lunge und wird in der Medizin zur Beurteilung von Atemwegserkrankungen eingesetzt. Die Schwierigkeit in der Aufzeichnung eines statistischen Druck-Volumen Diagramms besteht darin, daß die Druckänderungen nur stufenweise erfolgen können und der Druckaus-

gleich jedesmal mehrere Minuten benötigt. Kaum ein Versuch läßt jedoch eine derartig langsame Aufzeichnung zu. Daher hat man in der Literatur (71, 9o) für stufenweise oder langsam kontinuierlich aufgezeichnete Druck-Volumen Diagramme den Begriff "quasi-statisch" eingeführt. Bei allen in Tab. 13 aufgeführten Versuchen wurden "quasi-statische" Druck-Volumen Diagramme aufgezeichnet.
Als Maximaldruck wurde bei allen Messungen 25 cm H_2O gewählt, da nach Angaben von RADFORD (71) das Lungentotalvolumen bei diesem Druck erreicht ist. Dazu kommt, daß sich der "Air-trapping" Mechanismus bei höheren Drucken verstärkt (25), wodurch dieser methodische Fehler unnötig vergrößert wird. Ein Nachteil ist die geringere Vergleichbarkeit mit anderen Arbeiten, in denen zum Teil wesentlich höhere Maximaldrucke angewandt wurden.
Um die Reibungswiderstände so gering wie möglich zu halten, wurde eine Geschwindigkeit von 2 ml/min gewählt. Von allen in der Literatur angegebenen Geschwindigkeiten (2, 25, 26, 58, 75, 86) liegt dieser Wert am niedrigsten. Die Aufzeichnung eines Druck-Volumen Diagramms dauerte 15 - 18 Minuten. Sie ist damit ebenfalls wesentlich länger als bei anderen Autoren (2, 75).

Während der Versuche waren die Gleichlaufschwankungen des Spritzenantriebs ein Problem. Bedingt durch die Art der Steuerung sank bei einer Geschwindigkeit von 2 ml/min die Speisespannung des Spritzenantriebmotors auf 4,2 - 4,5 V und lag damit weit unter der Mindestbetriebsspannung von 15 V. Der Versuch,die Spannung zu erhöhen und mit Hilfe eines frequenzvariablen Unterbrechers trotzdem eine niedrige Geschwindigkeit zu erreichen, scheiterte an den Störströmen, die dann bei der Aufzeichnung des Druck-Volumen Diagramms auftraten. Daher konnten die Gleichlaufschwankungen nur durch ständiges Nachregulieren von Hand ausgeglichen werden.
Ein weiterer methodischer Fehler wurde durch die Kompressibilität der Luft hervorgerufen, er betrug 1 ml bei 25 cm H_2O. Der Durchmesser der Verbindungsschläuche von 2,5 mm ist ein Kompromiß zwischen dem Reibungswiderstand, zwischen Luft und Schlauchwand, sowie der Kompressibilität der Luft.

Der Kurvenverlauf der Druck-Volumen Diagramme in der vorliegenden Arbeit stimmt mit Kurvenverläufen in anderen Arbeiten überein (58, 75, 81). Bei Druck-Volumen Diagrammen atelektatischer Lungen ist nur der Exspirationsschenkel vergleichbar, während sich in der Inspirationsphase durch den oben erwähnten hohen Öffnungsdruck und das ungleichmäßige Füllungsverhalten große Unterschiede ergeben (27, 71, 86).

6.2.5. Auswertung des Druck-Volumen Diagramms

Eine Vielzahl von Parametern und mathematischen Gleichungen zur Auswertung des Exspirationsschenkels von Druck-Volumen Diagrammen sind in der Literatur beschrieben. Der in dieser Arbeit verwandte Parameter (Prozentsatz der Lungentotalkapazität bei 5 cm H_2O) hat den Vorteil, daß nur die Retraktionskräfte in den belüfteten Bezirken der Lungen zur Geltung kommen. Die nicht belüfteten Lungenbereiche und die Lungengröße spielen keine Rolle. Dieser Parameter ist daher der Aussagekräftigste, wenn, wie in der vorliegenden Studie, Veränderungen der Retraktionskräfte untersucht werden sollen.
Häufig werden die Druck-Volumenbeziehungen ausgedrückt als Lungenvolumen pro Gramm Lungengewebe bei einem bestimmten Druck (2, 51, 79, 81). Dieses Verfahren ist geeignet,um das Ausmaß unbelüfteter Lungenareale ermitteln zu können. Eine erhöhte Instabilität der Alveolen wird damit allerdings nur ungenau erfaßt, da in die Rechnung unbelüfteter Areale Fehler bei der Bestimmung des Lungengewichtes und die in der Lunge befindliche Flüssigkeit eingehen. Auch der Parameter Lungenvolumen pro Gramm Lungentrockengewicht vermeidet nur den durch die Flüssigkeit hervorgerufenen Fehler.

In dem Bemühen, größere Teile der Druck-Volumen Kurve auszuwerten, wurde von GRUENWALD (4o) ein Stabilitätsindex eingeführt, der von RÖFER (75) später modifiziert wurde. Da in dem Kurvenbereich zwischen 1o cm H_2O und O cm H_2O die Unterschiede zwischen hoher und geringer Stabilität am deutlichsten werden, geht dieser Teil in den Stabilitätsindex ein. Der Nachteil dieses bei einigen Messungen aus Vergleichsgründen ebenfalls verwandten Indexes besteht darin,

daß das Volumen bei 0 cm H_2O miteinbezogen wird. Die Druck-Volumen Beziehungen bei 0 cm H_2O sind jedoch starken Schwankungen unterworfen (4o, 75, 79). Dieses hängt mit der Instabilität der terminalen Luftwege und dem "Air-trapping" Mechanismus bei niedrigen Atemwegsdrucken zusammen (25).

Die nachfolgende Tabelle zeigt für gleiche Prozentzahlen der Lungentotalkapazität bei 5 cm H_2O unterschiedliche Stabilitätsindices und die dazugehörigen Volumina bei 0 cm H_2O

% Lungentotalkapazität bei 5 cm H_2O	Stabilitätsindex	Volumen (ml) bei 0 cm H_2O
59%	0,96	1,3
	0,94	0,8
	0,93	1,3
	0,92	1,4
61%	1,03	0
	0,97	1,8
	0,94	2,5
	0,92	2,1
62%	0,97	1,2
	0,94	1,5
	0,86	6,0

Generell läßt sich folgende Tendenz feststellen: Der Stabilitätsindex sinkt mit zunehmenden Volumen bei 0 cm H_2O.
Auch bei der Bestimmung der statischen Compliance (C_{st}) wird ein größerer Kurvenabschnitt berücksichtigt. Es wird die Steigung des quasi-linearen Teils der exspiratorischen Druck-Volumen Kurve zwischen 20% und 40% der Lungentotalkapazität berechnet. Gegen diesen Parameter spricht, daß es in dem exspiratorischen Teil der Druck-Volumen Kurve keine Gerade gibt, in der dieser Parameter konstant bleibt, wie in der Gleichung $C_{st} = \frac{\Delta V}{\Delta P}$ angenommen wird (69). Auch für die gesamte exspiratorische Druck-Volumen Kurve sind einige mathematische Modelle entwickelt worden. SALAZAR und KNOWLES (8o) führten als erste eine Exponentialgleichung ein, die alle

Werte oberhalb der funktionellen Residualkapazität erfaßt. Eine vergleichbare Exponentialfunktion stellten GIBSON (34) und SCHROTER (84) auf, die ebenfalls alle Werte oberhalb der funktionellen Residualkapazität erfassen sollte. Diese Funktionen wurden allerdings dem sigmoiden Charakter der "quasi-statischen" Druck-Volumen Kurven nicht gerecht. Es wurden daher mathematische Modelle entwickelt, die dem sigmoiden Verlauf angepasster waren (65, 69). Das hyperbolisch-sigmoide Modell von MURPHY (65) ergab dabei die beste Korrelation mit den in Versuchen gewonnenen Daten.

Allen diesen Modellen ist gemeinsam, daß sie aus Daten entwickelt wurden, die durch Druck-Volumen Messungen bei Menschen in vivo gewonnen wurden. Es ist verständlich, daß dabei eine Reihe von Faktoren, wie Retraktionskraft des Thorax und Messung des Drucks ösophageal, die Druck-Volumen Relation beeinflussen. Ein mathematisches Modell, ähnlich den oben beschriebenen, wurde für die isolierte Lunge bislang noch nicht entwickelt.

6.3. Entfernung des vorhandenen Surfactant

Die Entfernung des Surfactant durch wiederholte Spülung der isolierten Lunge, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, ist in der Literatur schon mehrmals beschrieben (1, 29, 35, 43, 56, 57, 58). Als Spülflüssigkeit diente dabei entweder physiologische Kochsalzlösung oder Ringerlösung. Die Menge des einzelnen Spülvorgangs darf dabei nicht das Lungenvolumen bei maximalem Druck überschreiten, um eine Zerstörung der Lunge zu vermeiden.
Der Verlust von sechs Lungen (= 11%) nach der Spülung ist nicht auf eine Überschreitung der Spülmenge zurückzuführen, sondern wahrscheinlich auf eine zu heftige Instillation der Spülflüssigkeit. Eine Kontrolle des Instillations- und Absaugdruckes wurde nicht durchgeführt. Ein zweimaliges Hin- und Herspülen erwies sich als günstiger, wenn man auch davon ausgehen muß, daß es für die Lunge belastender war. Ebenso erhöhte das kurzfristige Blähen der Lungen mit einem Druck von 30 cm H_2O die Ausbeute an oberflächenaktiver Substanz (35, 56, 75). Große Bedeutung wurde der vollständigen Entfernung der Spülflüssigkeit beigemessen.

Am Ende der Spülung wurden, nach kurzfristigem Blähen, durch vorsichtiges Absaugen immer 2 - 3 ml zusätzlich gewonnen. Dies könnte die Ursache für das Ansteigen des Phosphorgehaltes bei der letzten Spülung sein. Die Ursache für die signifikant unterschiedliche Menge an zurückgebliebener Spülflüssigkeit, je nach Spülmethode, ist unklar, da die Art des Absaugens bei beiden Methoden dieselbe war. Allerdings erschien 3 ml verbliebene Spülflüssigkeit immer noch sehr viel. FARIDY (2o) berichtet dagegen von einer Erhöhung des Lungengewichtes um das 1,96-fache nach Spülung. Von anderen Autoren liegen keine Angaben vor. Trotzdem scheint das Ausspülen des Surfactant in der beschriebenen Weise die geeignetste Methode zu sein, die Druck-Volumen Relation der Lunge entscheidend zu verändern (43).

Die in Tabelle 14 aufgeführten Versuche verändern alle die Surfactantfunktion oder vermindern den Surfactantgehalt der Lunge. Die Druck-Volumen Diagramme von am Atemnotsyndrom verstorbenen Kindern und diejenigen gespülter Lungen entsprechen sich jedoch am besten (38, 76).

6.4. Surfactantsubstitution

6.4.1. Herstellung des natürlichen Surfactant

Es wurde dabei nach der von ENHÖRNING (16) beschriebenen Methode verfahren. Im Gegensatz zu anderen Verfahren (2, 43, 5o, 72, 88) erfolgte bei dieser Methode keine Abtrennung der zellulären Bestandteile. Dies erklärt die hohe Viskosität des Substitutes, die eventuell zu einer Verstopfung einzelner terminaler Luftwege führte und so die Druck-Volumen Relation nicht in dem erwarteten Umfang verbesserte.

6.4.2. Instillation und Menge des Substitutes

Die tracheale Instillation des Surfactantsubstitutes ist inzwischen ein anerkanntes Verfahren, nachdem frühere Versuche mit Ultraschallverneblung (8, 43, 49, 74, 85) nicht erfolgreich waren. Demgegenüber schwanken die Angaben über die substituierte Menge. Dieser Arbeit wurde für die Mengenberechnung die Untersuchung von IKEGAMI (45) zugrundegelegt, die in Untersuchungen an frühgeborenen Lämmern 53 mg Phospho-

lipid/kg Körpergewicht als notwendige Dosis herausgefunden hatte. Im Vergleich zu anderen Angaben in der Literatur, die von 4 mg Phospholipid/kg Körpergewicht (17) bis zu 173 mg Phospholipid/kg Körpergewicht (45) reichen, liegen die 4o mg Phospholipid/kg Körpergewicht, die in dieser Arbeit angewandt wurden, im mittleren Bereich. Allerdings geben eine ganze Reihe von Autoren (2, 18, 39, 59, 72) nur die Menge der substituierten Flüssigkeit, nicht jedoch die Konzentration an.
Eine ungünstige Auswirkung auf den Erfolg der Substitution könnte die instillierte Flüssigkeitsmenge von 2 ml gehabt haben, die notwendig war, um den natürlichen Surfactant in Lösung zu halten. Der Versuch, die Konzentration zu erhöhen, scheiterte an der dann auftretenden hohen Viskosität des Substitutes. Bei Instillation des künstlichen Surfactantsubstitutes wurden nur 6oo µl appliziert, so daß hier der durch die Flüssigkeit verursachte Fehler wesentlich kleiner gewesen sein dürfte.

6.5. Beatmung

Große Bedeutung wurde dem positiv endexspiratorischen Druck (PEEP) beigemessen, da Untersuchungen ergeben haben, daß ein PEEP von 4 - 6 cm H_2O das "Air-trapping" wesentlich reduziert. Ohne PEEP-Beatmung sind in der isolierten Lunge nach zehn Beatmungszyklen 6o% der Luft gefangen (25). Auch der Abfluß des Surfactant über die Atemwege (21, 91) wird durch einen positiv endexspiratorischen Beatmungsdruck wesentlich verringert.
Sowohl FARIDY (21) als auch WYSZOGRODSKI (93) diskutierten die Möglichkeit, daß eine Inaktivierung des Surfactantfilmes durch Überkompression mit Hilfe des positiv endexspiratorischen Druckes verhindert werden kann.
Ein wesentlicher Nachteil des Beatmungsgerätes bestand in der fehlenden Möglichkeit, das Atemzugvolumen bestimmen zu können. Eine ausreichende Belüftung der Lungen konnte nur makroskopisch am Entfaltungsverhalten der Lunge kontrolliert werden.

Tab. 13: Übersicht über unterschiedliche Aufzeichnungsverfahren von Druck-Volumen Diagrammen

Autor	Lit.	isolierte Lunge von	Vorbehand.	Aufzeichn.	Zeit/Geschw.	Temp.	umgeb. Medium	max. Druck	Meßkriterien
GRIBETZ	38	verstorb.	-	stufenw.	?	?	?	35	Compliance
GRUENWALD	4o	Frühgeborener	-	stufenw.	?	?	?	6o	spez.Stab.in.
JOHNSON	51	Hunden	O_2-Absorpt.	stufenw.	?	?	Luft	4o-6o	% LTV Vol/Gew.
RÜFER	75	Ratten	Vorblähen	kontin.	1o min/ 2 ml/min	?	?	25	Stabilitäts-kennwert
SHANNON	85	Hunden	-	stufenw.	?	23°C	Luft	2o-25	Compliance
ENHÖRNING	16	Kaninchen	-	stufenw.	?	?	in situ	35	Volumen
SAHEBJAMI	78	Ratten	Vakuum	stufenw.	?	Raum-temp.	Luft	3o	% LTV Vol/Gew.
WYSZOGRODSKI	93	Katzen	Vakuum	stufenw.	?	Raum-temp.	Luft	18	% LTV Vol/Gew.
FARIDY	21	Hunden	Vakuum	stufenw.	?	Raum-temp.	?	3o	% LTV
FRAZER	25	Ratten	O_2-Absorpt.	kontin.	3,82 ml/min	?	NaCl-Lös.	3o	$\frac{V\ min}{V\ max}$
IKEGAMI	43	Ratten	Vakuum	stufenw.	16-23 min	21°C	NaCl-Lös.	3o	% LTV
GROSSMANN	39	Kaninchen	-	stufenw.	?	?	in situ	35	Öffnungsdr. Residualvol.
ADAMS	2	Lämmer	Vakuum	kontin.	7-17 min 2,4 ml/min.	37°C	in situ	3o	Vol/Gew.
BURNELL	6	Ratten	O_2-Absorpt.	stufenw.	?	?	angef. Luft	13	Compliance

Fortsetzung Tab. 13

IKEGAMI	44	Ratten	Vakuum	stufenw.	?	37°C	NaCl-Lös.	3o	% LTV
FRAZER	26	Ratten	Vakuum	kontin.	3,82 ml/min	28°C	angef. Luft	3o	$\frac{V\ min}{V\ max}$
SAHEBJAMI	79	Ratten	Vakuum + Vorblähen	stufenw.	?	Raum-temp.	in situ	3o	% LTV Vol/Gew.
LACHMANN	58	Schweinen	-	kontin.	5 ml/min	?	in situ	4o	% LTV
STENGEL	86	Ratten	O_2-Absorpt.	kontin.	3,82 ml/min	?	angef. Luft	3o	Volumen
SCARPELLI	81	Kaninchen	-	stufenw.	?	?	in situ	35-4o	% LTV Vol/Körper-gewicht
FARIDY	22	Ratten	Vakuum	stufenw.	?	Raum-temp.	in situ	4o	% LTV
KIDA	53	Ratten	Vakuum	stufenw.	?	?	?	3o	% LTV

% LTV = Prozent des Lungentotalvolumens beim maximalen Druck; Vol/Gew. = Volumen pro Gramm Lungengewicht

Tab. 14: Erfolgreiche Versuche zur Verminderung der Surfactantfunktion oder -konzentration

Autor	Lit.	Tiere	Methode	Bewertungskriterien
SCHOEDEL (1965)	83	Ratten	Zigarettenrauch in der Atemluft	Druck-Volumen Diagramm Hysteresefläche
SHANNON (197o)	85	Hunde	3-8-stündige Beatmung mit 1oo% Sauerstoff	Druck-Volumen Diagramm
RÜFER (1973)	77	Ratten	^{6o}Co-Bestrahlung der Lunge (Dosis 3ooo R)	Druck-Volumen Diagramm Phospholipidgehalt
BURNELL (1978)	6	Ratten	14 Wo. fettfreie Diät	Druck-Volumen Diagramm Gehalt an DPPC
SUZUKI (198o)	87	Ratten	intraperitoneale Inj. *von 4-APP	minimale Oberflächensp. Gehalt an PC und PG
SCHAPOWAL (198o)	82	Kaninchen	72-stündige Beatmung mit 1oo% Sauerstoff	Druck-Volumen Diagramm Alveolarepithelzellen
MEYER (1981)	62	Kaninchen	2 x 3o min Zigaretten-rauch in der Atemluft	Phospholipidgehalt
KIDA (1981)	53	Ratten	Einengung der Trachea	Druck-Volumen Diagramm Alveolenzahl

*4-APP = 4-Aminopyrazolo(3,4 d)pyrimidin

Tab. 15: Methoden zur Herstellung eines gereinigten Surfactant

Autor	IKEGAMI 1977, (43)	IKEGAMI 1979, (44)	JOBE 1981, (49)	SUZUKI 1982, (89)
Verfahren	Lavage zentrifugiert (11ooo U/min, 6o min) Pellet in NaCl, auf o,75 M Sucroselösung zentrifugiert (2oooo U/min, 6o min)	Lavage zentrifugiert (2oo x g, 7 min, 2o°C) Überstand zentrifugiert (1ooo x g, 6o min, 2°C) Pellet in NaCl-Lösung zentr. (2oo x g, 1o min) mehrmals wiederholt bis Pellet weiß war	Lavage zentrifugiert (8ooo x g, 3o min, 4°C) Pellet in NaCl, auf o,7 M Sucroselösung zentrifugiert (8ooo x g, 3o min, 4°C) Interphasematerial mit NaCl verdünnt zentrifugiert (27ooo x g, 2o min)	Lavage zentrifugiert (15oo U/min, 5 min) Überstand zentrifugiert (2oooo x g, 6o min, 4°C) Pellet in gepufferter NaCl-Lösung auf o,25/o,68 M Sucrose zentrifugiert (748oo x g, 6o min)
natürlicher Surfactant	Material aus Interphase	weißes Pellet	Pellet in destilliertem Wasser	Material aus Interphase
Oberflächenspannung bei Kompression	0 mN/m	1o mN/m	1o mN/m	1o mN/m

7. ERGEBNISDISKUSSION

7.1. Spülung des kleinen Kreislaufes

Zwischen Lungen mit gespültem und ungespültem kleinem Kreislauf zeigten sich Unterschiede in der Druck-Volumen Relation bei mehreren aufeinanderfolgenden Druck-Volumen Diagrammen. Überraschenderweise sank die Stabilität bei den Lungen mit gespültem kleinen Kreislauf rasch ab und zeigte dann vom 3. - 7. Druck-Volumen Diagramm dieselben Stabilitätskennwerte. Demgegenüber verrringerte sich die Stabilität bei den Lungen ohne Spülung langsamer, aber kontinuierlich. Eine mögliche Erklärung konnte das in der Lunge verbliebene geronnene Blut sein, das zusammen mit der Oberflächenspannung und der Gewebselastizität in das "quasi-statische" Druck-Volumen Diagramm eingeht (71). Daraus ergibt sich die Notwendigkeit einer sorgfältigen Spülung des kleinen Kreislaufes,um das Pulmonalblut als dritten Parameter auszuschalten. Von den verbleibenden zwei Parametern ändert sich die Gewebselastizität über Stunden kaum (71), so daß dann alle Veränderungen im Druck-Volumen Diagramm auf Veränderungen der Oberflächenspannung an der Luft-Wasser-Grenzfläche zurückgeführt werden können.

7.2. Spülung der Lungen

Die Methode des zweimaligen Hin- und Herspülens erwies sich als effizienter. Nach 6 Spülvorgängen waren bereits 87% der insgesamt herausgespülten Phospholipide entfernt. Dies entspricht den Untersuchungen von FUIJWARA (29) und GLUCK (35), die ebenfalls nach dem 6. Spülvorgang die Phospholipide weitestgehend entfernt hatten. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen steht jedoch die Phospholipidausbeute bei den letzten Spülvorgängen. Weder FUIJWARA noch GLUCK fanden in der letzten Spülflüssigkeit Phospholipide. Es gibt zwei Erklärungsmöglichkeiten für diesen Befund. Auf der einen Seite das zusätzliche Absaugen von 2 - 3 ml Flüssigkeit nach der letzten Spülung, auf der anderen Seite die Art der Phosphorbestimmung.

In den beiden anderen Arbeiten wurde die Spülflüssigkeit vor der Lipidextraktion zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen, während in der vorliegenden Arbeit die Lipidextraktion direkt durchgeführt wurde. Wie die elektronenmikroskopischen Untersuchungen jedoch zeigen, befinden sich in der Spülflüssigkeit eine Anzahl von Zellen (Erythrozyten, Typ II-Alveolarzellen, Makrophagen). die alle Phospholipide in größeren Mengen enthalten.

Die Veränderungen im Druck-Volumen Diagramm, die durch die Spülung hervorgerufen wurden, sind mit den Untersuchungen anderer Autoren vergleichbar (43, 75). Durch die histologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Alveolarstruktur nicht zerstört wird. Allerdings weist das Auffinden von Erythrozyten und Typ II-Alveolarzellen auf Verletzungen des Alveolarepithels hin.

7.3. Substitution der gespülten Lunge

7.3.1. Substitution mit natürlichem Surfactant

Die Substitution mit natürlichem Surfactant brachte eine deutliche Verbesserung der Druck-Volumen Relation, wenn auch die Ausgangswerte nicht mehr erreicht wurden. Dies entspricht nicht den Versuchsergebnissen von IKEGAMI (43, 44), die mit natürlichem Surfactant eine vollständige Wiederherstellung der Ausgangswerte erreichten. Eine mögliche Ursache könnte in der unzureichenden Funktion des Substitutes liegen. Auf der Wilhelmy-Waage senkte der natürliche Surfactant bei Kompression die Oberflächenspannung nicht unter 1o mN/m. Mehrere Autoren (4, 11, 36, 54) weisen darauf hin, daß eine wesentliche Voraussetzung für ein effektives Surfactantsubstitut die Fähigkeit ist, die Oberflächenspannung bei Kompression auf O mN/m zu senken. Leider liegen von anderen Autoren (13, 16, 39, 59, 63, 66), die denselben natürlichen Surfactant verwendeten, keine Untersuchungen auf der Wilhelmy-Waage vor.
Der von IKEGAMI verwendete mehrfach gereinigte natürliche Surfactant senkt die Oberflächenspannung auf der Wilhelmy-Waage bei Kompression auf O mN/m (Tab. 15).

7.3.2. Substitution mit künstlichem Surfactant

Das in der vorliegenden Arbeit angewandte künstliche Surfactantsubstitut entspricht den wesentlichen Forderungen,die MORLEY und BANGHAM (64) an ein künstliches Substitut gestellt haben. Es spreitet bei 37°C sofort zu einem Monolayer, bei Kompression sinkt die Oberflächenspannung auf 0 mN/m und erreicht auch bei vollständiger Entlastung nie 72 mN/m.
Bei einer Dosis von 58 mg/kg Körpergewicht verbesserte dieses Substitut die Druck-Volumen-Relation der gespülten isolierten Lunge. Allerdings zeigt sich auch in dieser Arbeit, wie bei allen anderen vorhergehenden vergleichenden Studien (43, 44, 63), daß der künstliche Surfactant die Druck-Volumen Relation nicht so effektiv verbessert. Die Ursache ist unklar. FUIJWARA (31) wies darauf hin,daß mehrere aufeinanderfolgende Zyklen auf der Wilhelmy-Waage die Hysteresefläche eines DPPC:PG (9:1) Filmes wesentlich verkleinern. Er vermutete, daß aus dem Film in die Subphase abgepresste Moleküle nicht rasch genug readsorbieren. Von zwei Autoren (55, 88) wird einem spezifischen Protein die Schrittmacherfunktion bei der raschen Readsorption zugewiesen. Diese Theorie wird in anderen Arbeiten (61, 73) jedoch bezweifelt.
Überraschend ist das schlechte Substitutionsergebnis mit 2o mg/kg Körpergewicht DPPC:PG (9:1). Dafür kann einerseits die zu geringe Menge des Substitutes verantwortlich sein, andererseits die lange Beatmungsdauer. Gegen den ersten Punkt spricht, daß es bei derselben Substitutionsmenge und einer kontinuierlichen Blähung der Lungen mit 15 cm H_2O zu einer Verbesserung der Druck-Volumen Relation gekommen ist. Dagegen hat FARIDY (21) gezeigt, daß es bei längerer Beatmung zu einem Abfluß des Surfactant aus den Alveolen über die Luftwege kommt. Dieser Verlust kann durch die Anwendung eines positiv-endexspiratorischen Drucks zwar vermindert, aber nicht vollständig verhindert werden.

7.4. Untersuchungen auf der Wilhelmy-Waage

Wie oben bereits erwähnt, vermindert der nach der Methode von ENHÖRNING (16) gewonnene natürliche Surfactant die Oberflächen-

spannung bei Kompression nicht unter 1o mN/m. Mehrfach gereinigte natürliche Surfactantpräparationen (43, 44, 5o, 89) senken dagegen die Oberflächenspannung bei Kompression unter 1o mN/m (Tab. 15). Es wurden keine Versuche durchgeführt, die zeigen konnten, daß der verwendete natürliche Surfactant in gereinigter Form die Oberflächenspannung unter 1o mN/m senkt.

Bei der nach Substitution mit DPPC:PG durchgeführten, erneuten Spülung der Lunge erwies sich die Spülflüssigkeit nicht in der Lage, die Oberflächenspannung bei Kompression unter 1o mN/m zu senken. Sobald jedoch die Spülflüssigkeit nach dem oben erwähnten Verfahren zentrifugiert war, senkte das Pellet die Oberflächenspannung auf 0 mN/m und zeigte nahezu dieselbe Hysterese wie das ursprüngliche Substitut DPPC:PG. Eine mögliche Ursache für diesen Befund könnte ein Inhibitor sein wie er von IKEGAMI (46, 47) für frühgeborene Lämmer nachgewiesen wurde.

8. ZUSAMMENFASSUNG

Die isolierte, gespülte Rattenlunge stellt ein einfaches Modell dar, das ähnliche Druck-Volumen Beziehungen aufweist wie die Lunge des unreifen neugeborenen Menschen. An diesem Modell wurden Substitutionen mit natürlichem und künstlichem Surfactant (DPPC:PG, 9:1) durchgeführt.

Durch Aufzeichnung von "quasi-statischen" Druck-Volumen Diagrammen konnten die Unterschiede zwischen der ungespülten, gespülten und substituierten Lunge aufgezeigt werden. Es wurde ein Versuchsaufbau und Verfahren erarbeitet, das eine einfache Durchführbarkeit sowie eine gute Reproduzierbarkeit der Versuche gewährleistet. Die angewandte Methode und die Ergebnisse wurden mit der Literatur verglichen und kritisch betrachtet.

Folgende Ergebnisse wurden gewonnen:

- Um eine eindeutige Aussage über die Veränderung der Oberflächenkräfte zu ermöglichen ist es notwendig,

die Pulmonalgefäße sorgfältig zu spülen.

- Die Spülung der Lunge ist die geeignetste Methode den Surfactant zu entfernen.
- Es bestehen keine morphologischen Unterschiede zwischen der gespülten und ungespülten Lunge.
- Sowohl die Substitution mit natürlichem als auch mit künstlichem Surfactant (DPPC:PG, 9:1) verbessert die Druck-Volumen Relation, ohne allerdings die ursprünglichen Verhältnisse wiederherstellen zu können.
- Auf der Wilhelmy-Waage gewonnene Ergebnisse sind nicht direkt auf das Modell der isolierten Rattenlunge übertragbar.

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. ADAMS, F.H., FUIJWARA, T., LATTA, H.: 'Alveolar' and whole lung phospholipids of premature newborn lambs. Correlations with surface tension, respiratory distress an pathology.
Biol. Neonate 17:198 (1971)

2. ADAMS, F.H., TOWERS, B., OSHER, A.B., IKEGAMI, M., FUIJWARA, T., NOZAKI, M.: Effects of tracheal instillation of natural surfactant in premature lambs. I. Clinical and autopsy findings.
Pediat. Res. 12:841 (1978)

3. AVERY, M.E., MEAD, J.: Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease.
Am. J. Dis. Child. 97:517 (1959)

4. BANGHAM, A.D., MORLEY, C.J., PHILLIPS, M.C.: The physical properties of an effective lung surfactant.
Biochim. Biophys. Acta 573:552 (1979)

5. BARTLETT, G.A.: Phosphorus assay in column chromatography.
J. Biol. Chem. 234:446 (1959)

6. BURNELL, J.M., KYRIAKIDES, E.C., EDMONDS, R.H., BLAINT, J.A.: The relationship of fatty acid composition and surface activity of lung extracts.
Resp. Physiol. 32:195 (1978)

7. BUSTOS, R., KULOVICH, M.V., GLUCK, L., GABBE, S.G., EVERTSON, L., VARGAS, C., LOWENBERG, E.: Significance of phosphatidylglycerol in amniotic fluid in complicated pregnancies.
Am. J. Obstet. Gynecol. 133:899 (1979)

8. CHU, J., CLEMENTS, J.A., COTTON, E.K., KLAUS, M.H., SWEET, A.Y., TOOLEY, W.H., BRADLEY, B.L., BRANDORFF, L.C.: Neonatal pulmonary ischemia. Part I: Clinical and physiological studies. Pediatrics 4o:7o9 (1967)

9. CLEMENTS, J.A.: Surface tension of lung extracts. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 95:17o (1957)

1o. CLEMENTS, J.A., HUSTEAD, R.F., JOHNSON, R.P., GRIBETZ, J.: Pulmonary surface tension and alveolar stability. J. Appl. Physiol. 16(3):444 (1961)

11. CLEMENTS, J.A.: Functions of the alveolar lining. Am. Rev. Resp. Dis. 115:67 (1977)

12. CUNNINGHAM, M., GREENE, J.M., THOMPSON, S.A., DESAI, N.S.: Antenatal reduction of surfactant phosphatidylglycerol (PG) in infants of diabetic mothers (IDM) with respiratoriy distress (RD). Pediat. Res. 1o:46o (1976)

13. CUTZ, E., ENHÖRNING, G., ROBERTSON, B., SHERWOOD, W.G., HILL, D.E.: Hyaline membrane disease. Effect of surfactant prophylaxis on lung morphology in premature primates. Am. J. Path. 92:581 (1978)

14. Documenta GEIGY: Wissenschaftliche Tabellen, Basel 1981

15. DUDENHAUSEN, J.W.: Clinical importance of surfactant defects in perinatology. Prog. Resp. Res. vol. 15:148 (Karger, Basel 1981)

16. ENHÖRNING, G., ROBERTSON, B.: Lung expansion in the premature rabbit fetus after tracheal deposition of surfactant. Pediatrics 5o:58 (1972)

17. ENHÖRNING, G., GROSSMANN, G., ROBERTSON, B.: Tracheal deposition of surfactant before the first breath.
Am. Rev. Resp. Dis. 1o7:921 (1973)

18. ENHÖRNING, G., HILL, D., SHERWOOD, G., CUTZ, E., ROBERTSON, B., BRYAN, C.: Improved ventilation of prematurely delivered primates following tracheal deposition of surfactant.
Am. J. Obstet. Gynecol. 132:529 (1978)

19. FARIDY, E.E.: Effect of hydration and dehydration on elastic behaviour of excised dogs lungs.
J. Appl. Physiol. 34:597 (1971)

2o. FARIDY, E.E.: Effect of distension on release of surfactant in excised dogs lungs.
Resp. Physiol. 27:99 (1976)

21. FARIDY, E.E.: Effect of ventilation on movement of surfactant in airways.
Resp. Physiol. 27:323 (1976)

22. FARIDY, E.E.: Pressure-volume characteristics of lungs of rats during pregnancy and postpartum.
Resp. Physiol. 43:43 (1981)

23. FARREL, P.M., WOOD, R.E.: Epidemiology of hyaline membrane disease in the United States: analysis of National Mortality Statistics.
Pediatrics 58:167 (1976)

24. FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G.H.S.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.
J. Biol. Chem. 226:497 (1957)

25. FRAZER, D.G., WEBER, K.C.: Trapped air in ventilated excised rat lungs.
J. Appl. Physiol. 4o(6):915 (1976)

26. FRAZER, D.G., STENGEL, P.W., WEBER, K.C.: Meniscus formation in airways of excised rat lungs.
Resp. Physiol. 36:121 (1979)

27. FRAZER, D.G., WEBER, K.C.: Trapped gas at maximum lung volume in intact isolated rat lungs.
Resp. Physiol. 37:173 (1979)

28. FRAZER, D.G., WEBER, K.C.: The effects of several gases (He, N_2, N_2O and SF_6) on gas trapping in excised lungs.
Resp. Physiol. 4o:323 (198o)

29. FUIJWARA, T., ADAMS, F.H., SIPOS, S., EL-SALAWY, A.: 'Alveolar' and whole lung phospholipids of the developing fetal lamb lung.
Amer. J. Physiol. 215:375 (1968)

3o. FUIJWARA, T., MAETA, H., CHIDA, S., MORITA, T.: Improved pulmonary pressure-volume characteristics in premature rabbits after tracheal instillation of artificial surfactant.
IRCS Med. Sci. 7:312 (1979)

31. FUIJWARA, T., ADAMS, F.: Surfactant for hyaline membrane disease.
Pediatrics 66: 795 (198o)

32. FUIJWARA, T., CHIDA, S. WATABE, Y., MAETA, H., MORITA, T., ABE, T.: Artificial surfactant therapy in hyaline membrane disease.
Lancet 12:55 (198o)

33. GEHR, P., BACHOFEN, M., WEIBEL, E.R.: The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity.
Resp. Physiol. 32:121 (1978)

34. GIBSON, G.J., PRIDE, N.B., DAVIS, J., SCHROTER, R.C.: Exponential Description of the static pressure-volume curve of normal and diseased lungs.
Am. Rev. Resp. Dis. 12o:799 (1979)

35. GLUCK, L., MOTOYAMA, E.K., SMITS, H.L., KULOVICH, M.V.: The biochemical development of surface activity in mammalian lung. I. The surface-active phsopholipids; the separation and distribution of surface-active lecithin in the lung of the developing rabbit fetus.
Pediat. Res. 1:237 (1967)

36. GOERKE, J.: Lung surfactant.
Biochim. Biophys. Acta 344:241 (1974)

37. GRAY, G.M.: Chromatography of lipids. The quantitative isolation of the minor (acidic) phospholipids and of phosphatidylethanolamin from the lipid extracts of mammalian tissues.
Biochim. Biophys. Acta 144:519 (1967)

38. GRIBETZ, J., FRANK, N.R., AVERY, M.E.: Static volume-pressure relations of excised lungs of infants with hyaline membrane disease.
J. Clin. Invest. 38:2168 (1959)

39. GROSSMANN, G.: Expansion pattern of terminal air-spaces in the premature rabbit lung after tracheal deposition of surfactant.
Pflügers Archiv 367:2o5 (1977)

4o. GRUENWALD, P.: A numerical index of the stability of lung expansion.
J. Appl. Physiol. 18:665 (1963)

41. HALLMAN, M., FELDMAN, B.H., KIRKPATRICK, E., GLUCK, L.: Absence of phosphatidylglycerol (PG) in respiratory distress syndrome in the newborn. Study of the minor surfactant phospholipids in the newborn. Pediat. Res. 11:714 (1977)

42. HEIN, H.A., BROWN, C.J.: Neonatal mortality review: a basis for improving care. Pediatrics 68:5o4 (1981)

43. IKEGAMI, M., HESTERBERG, T., NOZAKI, M., ADAMS, F.H.: Restoration of lung pressure-volume characteristics with surfactant: comparison of nebulization versus instillation and natural versus synthetic surfactant. Pediat. Res. 11:178 (1977)

44. IKEGAMI, M., SILVERMAN, J., ADAMS, F.H.: Restoration of lung pressure-volume characteristics with various phospholipids. Pediat. Res. 13:777 (1979)

45. IKEGAMI, M., ADAMS, F.H., TOWERS, B., OSHER, A.B.: The quantity of natural surfactant necessary to prevent the respiratory distress syndrome in premature lambs. Pediat. Res. 14:1o82 (198o)

46. IKEGAMI, M., JOBE, A., JACOBS, H., JONES, S.J.: Sequential treatments of premature lambs with an artificial surfactant and natural surfactant. J. Clin. Invest. 68:491 (1981)

47. IKEGAMI, M., JOBE, A., GLATZ, Th.: Surface activity following natural surfactant treatment in premature lambs. J. Appl. Physiol. 51(2):3o6 (1981)

48. IMMICH, H.: Medizinische Statistik Schattauer, Stuttgart-New York, 1974

49. IVEY, H., ROTH, S., KATTWINKEL, J.: Nebulization of sonicated phospholipids (PL) for treatment of respiratory distress syndrome (RDS) of infancy. Pediat. Res. 11:573 (1977)

5o. JOBE, A., IKEGAMI, M., GLATZ, T., YOSHIDA, Y., DIAKOMANOLIS, E., PADBURY, J.: Duration and characteristics of treatment of premature lambs with natural surfactant. J. Clin. Invest. 67:37o (1981)

51. JOHNSON, J.W.C., PERMUTT, S., SIPPLE, J.H., SALAN, E.S.: Effect of intra-alveolar fluid on pulmonary surface tension properties. J. Appl. Physiol. 19(4):769 (1964)

52. KANKARE, P., SUOVANIEMI, O.: A simple method for determination of phosphate from thin-layer-chromatography plates. J. chromat. 62:485 (1971)

53. KIDA, K., THURLBECK, W.M.: Tracheal banding in weanling rats diminishes lung growth and alters lung architecture. Pediat. Res. 15:269 (1981)

54. KING, R.J., CLEMENTS, J.A.: Surface active material from dog lung. II. Composition and physiological correlations. Am. J. Physiol. 223(3):715 (1972)

55. KING, R.J., MACBETH, M.C.: Physicochemical properties of dipalmitoylphosphatidylcholine after interaction with an apolipoprotein of pulmonary surfactant. Biochim. Biophys. Acta 557:86 (1979)

56. KÖTTER, D., RÖFER, R.: Oberflächenaktivität im Langmuir-Trog bei Quantitäts- und Qualitätsänderung von aktivem Material aus Rattenlungen. Resp. 25:35 (1968)

57. KREYSZIG, E.: Statistische Methoden und ihre Anwendungen. 7. Auflage, Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen 1979

58. LACHMANN, B., ROBERTSON, B., VOGEL, J.: In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome. Acta anaesth. scand. 24:231 (198o)

59. LACHMANN, B., GROSSMANN, G., NILSSON, R., ROBERTSON, B.: Effect of supplementary surfactant on in vivo lung mechanics in the premature rabbit neonate. Eur. J. Pediatrics 136:173 (1981)

6o. LORINO, A.M., HARF, A., ATLAN, G., LORINO, H., LAURENT, D.: Role of surface tension and tissue in rat lung stress relaxation. Resp. Physiol. 48:143 (1982)

61. METCALFE, J.L., ENHÖRNING, G., POSSMAYER, F.: Pulmonary surfactant-associated proteins: their role in the expression of surface activity. J. Appl. Physiol. 49:34 (198o)

62. MEYER, W., BURKHARDT, A., KLENKE, B., VOGTS, H., WILKE, A., WICHERT von, P.: Lung phospholipid metabolism after smoke exposure in rabbits. Prog. Resp. Res., Vol. 15:141, Basel 1981

63. MORLEY, C., ROBERTSON, B., LACHMANN, B., NILSSON, R., BANGHAM, A., GROSSMANN, G., MILLER, N.: Artificial surfactant and natural surfactant. Comparative study of the effects on premature rabbit lungs. Arch. Dis. Child. 55:758 (198o)

64. MORLEY, C., BANGHAM, A.D., MILLER, N., DAVIS, J.A.: Dry artificial lung surfactant and its effect on very premature babies. Lancet 1:64 (1981)

65. MURPHY, B.G., ENGEL, L.A.: Models of the pressure-volume relationship of the human lung.
Resp. Physiol. 32:183 (1978)

66. NILSSON, R., GROSSMANN, G., ROBERTSON, B.: Lung surfactant and the pathogenesis of neonatal bronchiolar lesions induced by artificial ventilation.
Pediat. Res. 12:249 (1978)

67. NOTTER, R.H., SHAPIRO, D.L.: Lung surfactant in an era of replacement therapy.
Pediatrics 68:781 (1981)

68. OBLADEN, M., BRENDLEIN, F., KREMPIEN, B.: Surfactant substitution.
Eur. J. Pediatr. 131:219 (1979)

69. PAIVA, M., YERNAULT, J.C., VAN EERDEWEGHE, P., ENGLERT, M.: A sigmoid model of the static volume-pressure curve of human lung.
Resp. Physiol. 23:317 (1975)

7o. PATTLE, R.E.: Properties, function and origin of the alveolar lining layer.
Nature 175:1125 (1955)

71. RADFORD, E.P., jr.: Static mechanical properties of mammalian lungs. In: Handbook of Physiology. Respiration.
Washington, D.C.: Am. Physiol. Soc., 1964, sect. 3, vol. 1, chapt. 15:429

72. ROBERTSON, B., ENHØRNING, G.: The alveolar lining of the premature newborn rabbit after pharyngeal deposition of surfactant.
Lab. Invest. 31:54 (1974)

73. ROBERTSON, B.: Surfactant substitution; Experimental models and clinical applications.
Lung 158:57 (198o)

74. ROBILLARD, E., ALARIE, Y., DAGENAIS-PERUSSE, P., BARIL, E., GUILBEAULT, A.: Microaerosol administration of synthetic - -Dipalmitoyl-L- -Lecithin in respiratory distress syndrome: A preliminary report. Canad. Med. Ass. J. 9o:55 (1964)

75. RÖFER, R.: Der Einfluß oberflächenaktiver Substanzen auf Entfaltung und Retraktion isolierter Lungen. Pflügers Archiv 298:17o (1967)

76. RÖFER, R.: The influence of surface active substances on alveolar mechanics in the respiratory distress syndrome. Resp. 25:441 (1968)

77. RÖFER, R., MERKER, H.-J., BUBLITZ, G.: Mechanik, Phospholipidgehalt und Morphologie der Rattenlunge nach ^{6o}CO-Bestrahlung. Strahlentherapie 145:55 (1973)

78. SAHEBJAMI, H., GACAD, G., MASSARO, D.: Influence of corticosteroid on recovery from oxygen toxicity. Am. Rev. Resp. Dis. 11o:566 (1974)

79. SAHEBJAMI, H., VASSALLO, C.L.: Static volume-pressure relationship in normal rate at various stages of growth. Resp. Physiol. 36:131 (1979)

8o. SALAZAR, E., KNOWLES, J.H.: An analysis of pressure-volume characteristics of the lungs. J. Appl. Physiol. 19:97 (1964)

81. SCARPELLI, E.M., KUMAR, A., DOYLE, C., CLUTARIO, B.C.: Functional anatomy and volume-pressure characteristics of immature lungs. Resp. Physiol. 45:25 (1981)

82. SCHAPOWAL, A., OSTERTAG, D.: Mechanische, biochemische und morphologische Veränderungen an Kaninchenlungen nach normobarer Sauerstoffintoxikation. Inauguraldissertation, Heidelberg (198o)

83. SCHOEDEL, W.: Einflüsse von Beatmung und Zigarettenrauch auf das statische Druck-Volumen Diagramm isolierter Rattenlungen. Pflügers Archiv 284:176 (1965)

84. SCHROTER, R.C.: Quantitative comparisations of mammalian lung pressure-volume curves. Resp. Physiol. 42:1o1 (198o)

85. SHANNON, D.C., KAZEMI, H., MERRIL, E.W., SMITH, K.A., WONG, P.S.-L.: Restoration of volume-pressure curves with a lecithin fog. J. Appl. Physiol. 28(4):47o (197o)

86. STENGEL, R.W., FRAZER, D.G., WEBER, K.C.: Lung degassing: an evaluation of two methods. J. Appl. Physiol. 48(2):37o (198o)

87. SUZUKI, Y., TABATA, R.: Selective reduction of phosphatidylglycerol and phsophatidylcholine in pulmonary surfactant by 4-aminopyrazolo (3,4d) pyrimidine in the rat. J. Lipid Res. 21:1o9o (198o)

88. SUZUKI, Y.: Effect of protein, cholesterol and phosphatidylglycerol on the surface activity of the lipid-protein complex reconstituted from pig pulmonary surfactant. J. Lipid Res. 23:62 (1982)

89. SUZUKI, Y., NAKAI, E., OHKAWA, K.: Experimental studies on the pulmonary surfactant. Reconstitution of surface-active material. J. Lipid Res. 23:53 (1982)

9o. TAMMERLING, G.J., QUANJER, Ph. H.: Physiologie der Atmung.
C.H. Boehringer Sohn, Ingelheim, 198o

91. WEBB, H.H., TIERNEY, D.F.: Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-exspiratory pressure.
Am. Rev. Resp. Dis. 11o:556 (1974)

92. WEIBEL, E.R.: Postnatal growth of the lung and pulmonary gas exchange capacity.
De Reubeck and Potter, Development of the lung.
Ciba Foundation Symposium, pp. 131, Churchill, London

93. WYSZOGRODSKI, J., KYEI-ABOAGYE, K., TAEUSCH, H.W., AVERY, M.E.: Surfactant inactivation by hyperventilation: conservation by end-exspiratory pressure.
J. Appl. Physiol. 38(3):461 (1975)

Herrn Prof. Dr. M. Obladen danke ich für die Überlassung des Themas und die vielen Anregungen bei der Durchführung der Arbeit.

Für die bereitwillige Hilfe und Aufmunterung während der Arbeit danke ich herzlich Frau D. Popp.

Herrn G. Bruder von den Wissenschaftlichen Werkstätten der Universität Heidelberg und Herrn U. Fritz von der Firma Roland Elektronik bin ich zu Dank verpflichtet für die Lösung der elektronischen Steuerungs- und Regelprobleme.

Herrn Dr. H. Schwarz vom Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen, danke ich für elektronenmikroskopische Untersuchungen und Frau Prof. Dr. H. Fischbach für die Hilfe bei den histologischen Untersuchungen.

Lebenslauf

Am 10. Juni 1953 wurde ich, Christoph Bernhard Reinhold Schöll als Sohn des Diplom Ingenieurs Reinhold Schöll und seiner Ehefrau Dr. med. Lore Schöll in Stuttgart geboren.

1960-1964	Besuch der Grundschule in Ditzingen
1964	Eintritt in den altsprachlichen Zweig des Gymnasiums Korntal
1972	Abitur
1972-1974	16 monatiger Zivildienst in der Evangelischen Diakonissenanstalt in Stuttgart, während dieser Zeit Beginn einer Krankenpflegeausbildung
1976	Krankenpflegeexamen
1976/1977	Anästhesiepfleger im Diakonissenkrankenhaus in Stuttgart
1977	Beginn des Medizinstudiums in Ulm
1979	Ärztliche Vorprüfung und Wechsel an die Universität Tübingen
1980	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1981/1982	Doktorarbeit bei Prof. Dr. M. Obladen in der neonatologischen Abteilung der Universitätskinderklinik Tübingen
1983	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1983/1984	Praktisches Jahr am Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart
1983	Heirat mit Gertrud Günther
9. 4. 1984	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung